

THÈSE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE DIJON

pour obtenir le grade de

DOCTEUR - INGENIEUR ES SCIENCES

par

Parviz ARBABI

Né le 24 Février 1942
en Azerbaïdjan Oriental (IRAN)

*
* *

RECHERCHES SUR LES LEUCOCYTES DU LAIT

Soutenue le 24 JUILLET 1969, devant la Commission d'Examen

MM. C. BARON

Président et Rapporteur

J. KEILLING

P. PADIEU

Examineurs

Mlle D. SIMATOS

M. E. RIAHI

Invité d'honneur

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE DIJON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR-INGENIEUR ES SCIENCES

par

Parviz ARBABI

RECHERCHES SUR LES LEUCOCYTES DU LAIT

Soutenue le 24 juillet 1969, devant la Commission d'examen

MM.	C. BARON	Président et rapporteur
	J. KEILLING)	
	P. PADIEU)	Examineurs
Mlle	D. SIMATOS)	
M.	E. RIAHI	Invité d'honneur



UNIVERSITE DE DIJON

FACULTE DES SCIENCES

Octobre 1969

Doyen : Madame F. MORET-BAILLY

Assesseur : Monsieur J. TIROUFLET

Professeurs : R. CIRY
B. D'ORGEVAL - DUBOUCHET
J. BOUCHARD
C. ARNAL
R. HUSSON
J. ARBAULT
P. BARRET
G. CLEMENT
C. BARON
C. NOIROT
P. HENRY
R. AMIOT
P. RAT
P. VERNIER
J. CHAUDONNERET
F. BUGNON
Mme G. WATELLE
P. PIGEAUD
P. FOURNARI
J. MORET-BAILLY
M. TINTANT
P. CACHON
L. GODEFROY
G. JOUBERT
J. TIROUFLET

Professeur honoraire :
F. LAGRANGE

Maitres de conférences :
M. GUYOT
J. BEZARD
Mme G. GODEFROY
J. ROUBAUD
P. FEUILLEE
M. PERSON
M. FLATO
Mme F. MORET-BAILLY

A Monsieur Christian BARON,
Professeur à la Faculté des Sciences de l'Université de Dijon

Durant ces quatre années, au cours du lent apprentissage de la rigueur et de l'honnêteté scientifique, vous m'avez fait l'honneur de m'accorder, sans compter, le soutien de votre vigilante et souriante amitié.

A travers votre exemple de brillant pédagogue, vous avez su me faire découvrir le sens humain de votre métier.

Je vous exprime ma profonde et respectueuse gratitude.

A mon père, à ma mère

pour leur enthousiasme et leur patience

A mes parents

Les recherches qui font l'objet de cette thèse ont été suscitées par Monsieur le Professeur J. KEILLING qui a été le premier guide de mes études en FRANCE.

Le présent travail a été réalisé aux :

- laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences
- laboratoire de Biochimie générale de l'Institut de Biologie
Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation de l'Université
de Dijon

sous la direction de Monsieur le Professeur C. BARON

Je tiens ici à leur exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir fait l'honneur de m'accueillir en FRANCE et pour la bienveillance et la confiance qu'ils ont sans cesse témoignées à mon égard.

JURY :

M. C. BARON : Président et rapporteur
Professeur de Biochimie Générale à la Faculté des
Sciences et à l'I.B.A.N.A.

M. J. KEILLING : Examineur
Professeur de Technologie à l'Institut National
Agronomique de Paris, Directeur de l'I.B.A.N.A.,
Membre de l'Académie d'Agriculture de FRANCE.

M. P. PADIEU : Examineur
Professeur de Chimie Médicale à la Faculté de
Médecine de Dijon

Mlle D. SIMATOS : Examinatrice
Maître de Conférences de Biologie Physico-Chimie
à l'I.B.A.N.A.

M. E. RIAHI : Invité d'Honneur
Professeur de Technologie à la Faculté d'Agronomie
de l'Université de TEHERAN (IRAN)

Je leur présente mes très respectueux remerciements
pour l'honneur qu'ils m'ont fait en voulant bien juger ce travail.

RECHERCHES SUR LES LEUCOCYTES DU LAIT
Etudes biométriques et enzymologiques ;
applications technologiques

INTRODUCTION

Le LAIT, aliment presque complet, a une importance capitale dans l'alimentation de l'homme, ce qui justifie les très nombreuses études et recherches dont il a été et dont il est encore l'objet.

Certes, une connaissance précise sur les constituants du lait est indispensable afin d'améliorer et conserver sa valeur alimentaire.

Les LEUCOCYTES constituent une partie importante du contenu cellulaire du lait ; mais peu de travaux détaillés ont été effectués à notre connaissance dans ce domaine.

L'existence de très nombreux ENZYMES dans le lait pose également le problème de leurs origines qui sont le plus souvent assez mal définies. Ils peuvent en effet être synthétisés par la glande mammaire, provenir du plasma sanguin, être sécrétés par les leucocytes ou encore par les bactéries présentes dans le lait.

Il nous a donc paru intéressant d'effectuer une recherche précise sur les leucocytes du lait et de déterminer si certains enzymes du lait, de diverses provenances possibles, pouvaient avoir aussi une origine leucocytaire.

Le travail que nous rapportons ici a donc gardé l'empreinte du but poursuivi et il se présente en trois parties :

- la première partie est consacrée à l'étude biométrique des leucocytes du lait
- la deuxième partie porte sur les essais enzymologiques
- la troisième se propose d'analyser et de synthétiser les résultats obtenus dans un but d'applications technologiques.

GENERALITES

I - Position du problème

II - Bref aperçu historique des recherches effectuées jusqu'à présent
sur les cellules du LAIT

III - Origine des cellules du LAIT NORMAL

IV - Orientation de notre travail

Bibliographie

I - POSITION DU PROBLEME

Le lait normal (+) possède des éléments figurés. Selon leurs origines et leurs natures, nous proposons la classification suivante :

Eléments figurés du lait :

A - Globules gras

B - Microbes

C - Cellules provenant du sujet laitier :

1° - Cellules épithéliales (glande mammaire)

2° - Leucocytes (++) :

a) Polynucléaires (sang)

b) Mononucléaires : - lymphocytes (sang et lymphe)
- monocytes (sang et lymphe)

3° - Erythrocytes (+++) (sang) ?

4° - Thrombocytes (++++) (sang) ?

Les globules gras sont à l'état d'émulsion dans le lait, et leur structure particulière a fait l'objet de très nombreuses études.

Les microbes sont traités dans le cadre de la microbiologie du lait.

L'étude des cellules du lait peut être nommée "cytologie du lait". C'est un domaine très rarement exploré jusqu'à présent dans les sciences du lait.

(+) Dans cette thèse, le lait sans autre précision désigne le lait de vache

(++) Leucocyte (du Gr. leukos : blanc, et kutos : cellule) = Globule blanc.

(+++) Erythrocyte = Hématie = Globule rouge

(++++).Thrombocyte = Plaque sanguine

II - BREF APERÇU HISTORIQUE DES RECHERCHES EFFECTUEES JUSQU'A PRESENT SUR LES CELLULES DU LAIT

Les leucocytes ont été découverts dans le sang par SPALLANZANI en 1768 et par HEWSON en 1770, puis signalés par LEEUWENHOEK dans le chyle, en 1772 (14). Depuis cette date, les recherches entreprises sur les leucocytes du sang sont innombrables.

Mais jusqu'à nos jours, les cellules en général et les leucocytes en particulier, sont très peu étudiés dans le lait ; la littérature scientifique ne peut nous donner que des informations fragmentaires :

1897

Le Docteur STOKES, de Baltimore, attire l'attention sur la présence de cellules dans le lait, et reconnaît parmi elles les leucocytes sanguins qu'il considère comme des "cellules du pus".

STOKES et WEGEFARTH tentent les premiers une numération des cellules dans le lait (4c), mais leur méthode, faute de précision, fut abandonnée.

1910

PRESCOTT et BREED proposent la méthode suivante pour la numération des corps cellulaires du lait : "On prélève dans l'échantillon de lait, "après agitation, une petite goutte de 10 mm^3 qu'on étale sur une surface de 1 cm^2 sur lame de verre ; le frottis est séché, coloré et "les cellules comptées au microscope." (15)

Par cette méthode, ils constatent que le nombre moyen et total des cellules présentes dans le lait est de $1500/\text{mm}^3$.

Ils trouvent également des valeurs extrêmes allant de 100 à $10\,690 \text{ cellules}/\text{mm}^3$.

1927

BOURGEOIS, (4) établit la formule leucocytaire et propose une méthode de leucocyto-diagnostic du lait

1930

LOTH, (13) à l'examen microscopique de lait malpropre, rencontre des cellules variées

1932

GENIN, (7) pense que l'élimination des cellules contenues dans le lait constitue une amélioration de la qualité de ce lait et à son point de vue, la centrifugation est bien supérieure à la filtration

1937

GIROUX, (8) remarque que l'épuration par centrifugation ou par filtration pourrait éliminer une partie importante du contenu cellulaire du lait

1939

WHITESIDE, (28) découvre qu'il y a une relation étroite entre le nombre de cellules dans le lait et sa viscosité qui est appréciée en mélangeant cinq gouttes de lait sur une plaque de verre, avec une goutte de NaOH à 4 %

1947

THIEULIN et VUILLAUME, (25) préconisent l'examen cytologique comme l'une des méthodes utiles dans l'inspection du lait

1955

EGLI, (6) examine la relation entre le contenu cellulaire du lait et les maladies de la mammelle

1957

SCHALM et NOORLANDER, (24, 23) mettent au point la méthode du California Mastitis Test (C.M.T.) et expliquent le résultat de ce test par rapport à la richesse cellulaire du lait

1963

PAAPE, HAFS, et SYNDER, (16) : d'une part, en utilisant la méthode de numérotation de BREED et l'analyse statistique, cherchent à connaître les causes d'erreurs au cours du comptage des cellules dans le lait. D'autre part, (17) ils déterminent la richesse cellulaire du lait et l'état physiologique des pis par la réaction de FEULGEN au D.N.A.

KEILLING et CAMUS, (11) évoquent l'irrégularité et l'hétérogénéité des dépôts de boues se rassemblant dans le bol des épurateurs centrifuges du lait. Cette irrégularité peut provoquer des encombrements

imprévus de la chambre à boues et des entraînements de sédiments provoquant des contaminations sporadiques mais massives du lait épuré

1965

WHITTLESTONE et DE LANGEN, (29) étudient dans le lait la relation entre le comptage de leucocytes, le dosage de la concentration en A.D.N. (Acide désoxyribonucléique) et la réaction de C.M.T. (California Mastitis Test) pour le diagnostic de la mammite.

1966

HAUKE et LUTTICH, (10) trouvent une corrélation entre la teneur en A.D.N. et la richesse cellulaire du lait.

PHIPPS et NEWBOULD, (19, 18) pour la première fois, tentent de compter les cellules du lait avec le compteur électronique de COULTER (5). Ils cherchent à établir une corrélation entre cette méthode de comptage et le comptage direct au microscope.

TOLLE, ZEIDLER et HEESCHEN, (26) proposent une technique améliorée pour la numération cellulaire et microbienne du lait au compteur électronique de COULTER.

KASTLI, BAUMGARTNER et RUTIMANN, (12) découvrent qu'un nombre élevé de cellules pourrait avoir une action inhibitrice sur la croissance de certaines bactéries dans le lait.

BLACKBURN, (3) vérifie la variation de la teneur cellulaire du lait en rapport avec la période et le nombre de lactations.

1967

HAUKE (9) explique la spécificité de la réaction de FEULGEN dans le lait et sa relation avec la teneur en A.D.N. et la richesse cellulaire du lait. Le résultat de cette étude pourrait servir au diagnostic de la mammite.

RENNER, KIERMEIER et DJAFARIAN, (22) cherchent l'influence d'une teneur élevée de cellules sur la viscosité et le pH. du lait.

1968

AFIFI, (1b) constate d'une part qu'un vide plus poussé que 40 cm de mercure et d'autre part que le taux de pulsation supérieur à 50 pulsations par minute, dans la machine à traire, ont tendance à accroître le nombre de leucocytes dans le lait.

Enfin, (1 a) il explique l'influence de la mammite et de la quantité de lait journalière sur le contenu leucocytaire du lait.

PROBST, BEHRINGER et KIERMEIER, (20) découvrent que la teneur du lait en cellules augmente avec l'âge, avec la production annuelle élevée du lait, le nombre de lactations, et avec la fin de chaque lactation.

Le lait des vaches qui vèlent en décembre et janvier a le plus bas taux de cellules, alors que le contenu cellulaire est le plus haut lorsque le vêlage a lieu en juin-juillet.

En conclusion :

Après cette courte recherche bibliographique (+), on peut facilement constater que la plupart des auteurs ont étudié l'ensemble des cellules du lait sans avoir à établir entre elles de distinction. Le plus souvent, ils tentaient de trouver par cette voie une méthode de diagnostic de la mammite. C'est pourquoi les précisions apportées sur chaque catégorie de population cellulaire du lait sont très restreintes.

(+) J'exprime mes plus vifs remerciements

à Monsieur A. CAMUS, Directeur de recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique, (I.N.A., Paris) pour l'attention qu'il a portée à mon travail et les précieux documents qu'il a mis à ma disposition,

à Monsieur J.P. POISSON, Assistant à l'Institut Universitaire de Technologie de Dijon, qui m'a très amicalement aidé dans l'élaboration de certains éléments de cette étude bibliographique.

III - ORIGINE DES CELLULES DU LAIT NORMAL (+)

La mamelle est une glande "HOLOMEROCRINE". Dans ce type de glande, la partie apicale des cellules sécrétrices sert à constituer le produit de la sécrétion, (21a, b). D'autre part, dans une glande aussi active que la mamelle, par l'usure physiologique des revêtements des canaux galactophores et des parois des acini, des cellules épithéliales passent dans le lait (4a).

Ce sont des cellules dont, en général, la membrane est rompue (cellules mortes). Parfois leur membrane est intacte, mais elles sont immobiles, inactives, plus ou moins dégénérées ; leur étude ne présente pas beaucoup d'intérêt.

La mamelle est fortement irriguée par deux vastes réseaux capillaires, alimentés par l'artère honteuse externe. Le débit sanguin passant par le pis est considérable ; on l'estime à environ 400 litres de plasma sanguin pour un litre de lait (2).

Les polynucléaires, beaucoup plus abondants dans le sang que dans la lymphe, semblent surtout d'origine sanguine, bien qu'il n'y ait pas d'étude définitive sur ce sujet.

Les systèmes veineux et lymphatique de la mamelle sont très complexes.

La lymphe contient 80 % de lymphocytes et 10-12 % de monocytes ; ces deux catégories de leucocytes passent non seulement du sang dans le lait mais encore de la lymphe dans le lait.

Donc, les leucocytes du lait pourraient avoir une double origine (4b) : origine sanguine pour les polynucléaires, et origine à la fois sanguine et lymphatique pour les monocytes et les lymphocytes.

(+) On appelle "lait normal" le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (27).

Les érythrocytes et les thrombocytes sont considérés comme des éléments rigoureusement spécifiques du sang, parce qu'ils sont incapables de diapédèse. Leur passage dans le lait NORMAL n'a jamais été vérifié. Donc, leur présence dans notre classification (p. 3) est purement hypothétique.

Les leucocytes constituent la plus grande partie du contenu cellulaire du lait ; ils sont des éléments souvent vivants, actifs, quelques-uns mobiles, constants dans le lait, mais en quantité et qualité très variables.

C'est pour cela que nous avons décidé d'étudier et de caractériser les leucocytes du lait, par des méthodes de "CYTOLOGIE" moderne et, d'autre part, nous avons tenté de savoir si les leucocytes pouvaient aussi être à l'origine d'une partie de certains enzymes du lait.

C'est pour répondre à ces deux questions que nous avons effectué le travail présenté ci-après.

IV - ORIENTATION DE NOTRE TRAVAIL

Nous attribuons un double intérêt à l'étude des leucocytes dans le lait.

D'une part, l'activité biologique des leucocytes et les enzymes d'origine leucocytaire peuvent-ils influencer sur les propriétés biochimiques du lait ?

Une recherche précise sur les leucocytes du lait peut-elle donc avoir des conséquences technologiques ?

D'autre part, l'étude des leucocytes du lait est, à elle seule, un exemple intéressant d'une investigation de la biologie des leucocytes dans un milieu extra-vasculaire.

Aussi, les renseignements apportés peuvent-ils contribuer, en perspective, à l'élargissement des connaissances sur les leucocytes, cellules dont l'importance est capitale en biologie humaine.

En abordant cette recherche, nous avons décidé de tenter de résoudre dans l'ensemble de notre travail les problèmes suivants :

- 1° - Mettre au point une méthode de LEUCO-CONCENTRATION du lait et obtenir des leucocytes en quantité importante mais le plus intacts possibles du point de vue biologique et biochimique.
- 2° - Proposer et expliquer une technique améliorée pour le comptage des leucocytes dans le lait et connaître les directives à respecter lors de la préparation des échantillons.
- 3° - Etudier les leucocytes du lait en microscopie photonique afin d'effectuer des analyses biométriques et, si possible, en microscopie électronique pour apporter des renseignements ultra-structuraux.
- 4° - Vérifier s'il existe des rapports leucocytaires entre le sang et le lait chez un même sujet.
- 5° - Mettre en relief certaines activités biologiques des leucocytes dans le lait et définir leur comportement en rapport avec la qualité du lait.

- 6° - Essayer de mettre en évidence certaines activités enzymatiques des leucocytes du lait par des méthodes biochimiques et par des détections cytochimiques.
- 7° - Expliquer l'utilité des informations sur les leucocytes du lait, comme l'un des moyens d'inspection de la qualité du lait.
- 8° - Envisager les conséquences technologiques dues à la présence de leucocytes dans le lait.

Dans cette étude, nous avons prévu de travailler d'une part sur le LAIT de VACHE pour son importance économique qui dépasse de très loin celle de tous les autres laits et, d'autre part, sur le LAIT de FEMME, en raison de sa valeur vitale pour la santé des nourrissons.

BIBLIOGRAPHIE

A

- 1 - AFIFI Y.A. - Neth. Milk & Dairy J., (1968), 22, (a) 83, (b) 98
- 2 - ALAIS C. - Sciences du lait, 2e éd., S.E.P., Paris, (1965), 20

B

- 3 - BLACKBURN P.S. - J. Dairy Res., (1966), 33, 193
- 4 - BOURGEOIS E.A.G. - Th. Doct. - vét. Paris, (1927), (a) 15,
(b) 16, (c) 20.

C

- 5 - COULTER W.H. - Proc. Natn. Electron. Conf., (1956), 12, 1034
- 6 - EGLI R. - Th. Doct.-vét., Berne, (1955), 25

G

- 7 - GENIN G. - Le Lait, (1932), 12, 839
- 8 - GIROUX J. - Le Lait, (1937), 17, 354
- 9 - HAUKE H. - Milchwissenschaft, (1967), 22, 269
- 10 - HAUKE H., LUTTICH V. - Milchwissenschaft, (1966), 21, 620

K

- 11 - KEILLING J. et CAMUS A. - Industrie Laitière, (1963), 198, 91
- 12 - KASTLI P., BAUMGARTNER H., RUTTIMANN G. - Path. Micro-
biol., (1966), 29, 630

L

- 13 - LOTH R. - Le Lait, (1930), 10, 655

M

- 14 - MALLARME J. et MESSERSCHMITT J. - Les cahiers d'hématologie, éd. S.E.D.E.S., Paris, (1948), 27

P

- 15 - PRESCOTT S.C. et BREED R.S. - J. Infect.Dis., (1910), 7, 632
- 16 - PAAPE M.J., SNYDER W.W. et HAFS H.D. - J. Animal. Sci., (1962), 21, 1028
- 17 - PAAPE M.J., HAFS H.D. et SNYDER W.W. - J. Dairy. Sci., (1963), 46, 1211
- 18 - PHIPPS L.W. et NEWBOULD F.H.S. - J. Dairy Res., (1966), 33, 51
- 19 - PHIPPS L.W. et NEWBOULD F.H.S. - Vet. Res., (1965), 77, 1377
- 20 - PROBST A., BEHRINGER J. et KIERMEIER F. - Milchwissenschaft, (1968), 23, 395

R

- 21 - ROCHAIX A. et TAPERNOUX A. - Le lait et ses dérivés, 2e éd. Vigot, Paris, (1948), (a) 5, (b) 109
- 22 - RENNER E., KIERMEIER F. et DJAFARIAN M. - Milchwissenschaft, (1967), 22, 285
- 23 - RULLIER J. et PARODI A. - Laboratoire et Diagnostic en Médecine vétérinaire, éd. Vigot, Paris, (1968), 527

S

- 24 - SCHALM O.W. et NOORLANDER D.O. - J. Amer. vet. Ned. Assn., (1957), 130, 199

T

- 25 - THIEULIN G. et VUILLAUME - Eléments pratiques d'analyse et d'inspection du lait, (Le Lait), Paris, (1947), 111, 117, 189

- 26 - TOLLE A., ZEIDLER H. et HEESCHEN W. - Milchwissenschaft,
(1966), 21, 93

V

- 27 - VEISSEYRE R. - Techniques Laitières, 2e éd., Maison Rustique,
Paris, (1965), 1

W

- 28 - WHITESIDE W.H. - Canad. Pub. Health. J., (1939), 30, 44
29 - WHITTLESTONE W.G. et DE LANGEN - New Zealand Soc.
Anim. Prod., (1965), 25, 137

RECHERCHES PERSONNELLES

PREMIERE PARTIE

Etudes Biométriques

CHAPITRE I

I - PROVENANCE DE NOS ECHANTILLONS

Le lait utilisé au cours de nos recherches provenait de vaches de la race "Pie Rouge". Dans cette race, les aptitudes laitières et bouchères sont harmonieusement combinées.

Actuellement, plus de 35 millions de têtes de cette race sont recensées en Europe.

Avant de commencer nos expériences, nous avons choisi trois vaches laitières dans une ferme, aux environs immédiats de Dijon⁽⁺⁾ (Saint-Apollinaire, à environ 4 km du laboratoire). Ces trois animaux ont été sélectionnés par un examen minutieux de leurs caractéristiques ZOOTECHNIQUES⁽⁺⁺⁾ pour qu'ils soient des individus moyens et suffisamment représentatifs de leur race.

Ces vaches laitières étaient de la race "Pie Rouge de l'Est", parfaitement bien portantes, bien entretenues, indemnes de maladies, à mamelles saines et dont le lait semblait normal quant à ses caractères physiques.

II - PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

Le prélèvement propre, destiné à recueillir un lait individuel, est effectué directement à la mamelle.

La mamelle est préalablement lavée à l'eau tiède savonneuse, puis séchée avec un linge propre.

Le lait des premiers jets de la traite, trop contaminé, est

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance :

(+) à Madame H. ROSSAIN, pour la confiance avec laquelle elle a mis ses vaches laitières à mon entière disposition. Sans sa bienveillance, mes nombreux échantillonnages n'auraient pas pu être réalisés de façon aussi méticuleuse.

(++) à Monsieur M. TALPIN, Directeur du Syndicat de Contrôle Laitier de la Côte d'Or, pour l'amabilité avec laquelle il m'a communiqué les dossiers des animaux destinés à mes expériences.

éliminé. Les échantillons de lait sont recueillis directement dans des flacons très propres, rincés à l'eau distillée et séchés (+).

L'échantillon ainsi préparé, rapidement acheminé au laboratoire, est maintenu à + 4° C et examiné dans un bref délai pour que l'intégrité morphologique des leucocytes subsiste.

III - EXPERIENCES PRELIMINAIRES

En vue de l'observation des leucocytes du lait au microscope photonique, nous procédons à la confection de frottis.

La parfaite netteté des leucocytes, qui est la règle dans les frottis de sang effectués par une personne entraînée, n'est pas toujours obtenue dans les frottis de lait. La viscosité et l'opacité de ce liquide sont en effet de sérieux obstacles à cette netteté.

IV - CONFECTION DES FROTTIS

Réputée facile, elle est cependant souvent imparfaitement réalisée par manque de précautions ou de matériel approprié.

1° - Matériel nécessaire :

- lame de verre porte-objet
- lamelle d'une largeur inférieure à celle de la lame porte-objet et dont un côté a été rodé (lamelle étaleuse)

2° - Nettoyage des lames et lamelles :

- Laisser séjourner 24 heures les lames et lamelles dans une solution sulfochromique : H_2SO_4 R.P. 250 ml
 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ R.P. 150 g
 H_2O distillée 2500 ml
- Laver abondamment à l'eau. Rincer à l'eau distillée, puis à deux reprises dans l'alcool éthylique à 95°.
Mettre en réserve dans l'alcool.
- Au moment de l'emploi, retirer de l'alcool éthylique et essuyer avec un linge propre, fin et non pelucheux.

(+) Les prélèvements sont effectués au début, au milieu ou à la fin de la traite, selon le but de l'expérience.

3° - Technique d'étalement

Une petite goutte du lait de 2 à 3 mm de diamètre est déposée à un cm de l'extrémité d'une lame porte-objet propre.

L'arête rodée d'une lamelle inclinée à 30-45° est placée au contact de la lame au point où se trouve la gouttelette, tangentielle-ment à celle-ci du côté de la surface d'étalement.

On attend que la goutte ait migré par capillarité tout le long de l'arête du dièdre ainsi formé. On fait glisser la lamelle d'un seul coup et avec un mouvement régulier et sans arrêter, vers l'autre extrémité de la lame.

Pour que les éléments cellulaires soient étalés sans écrasement sur lame, le lait doit suivre la lamelle et ne doit pas être poussé par elle. La totalité de la goutte de lait doit être régulièrement étalée sur la lame, sinon la lamelle entraine avec l'excès la plupart des gros éléments cellulaires. Les bords du frottis, presque rectilignes, doivent être en retrait de 1 à 2 mm par rapport aux bords de la lame.

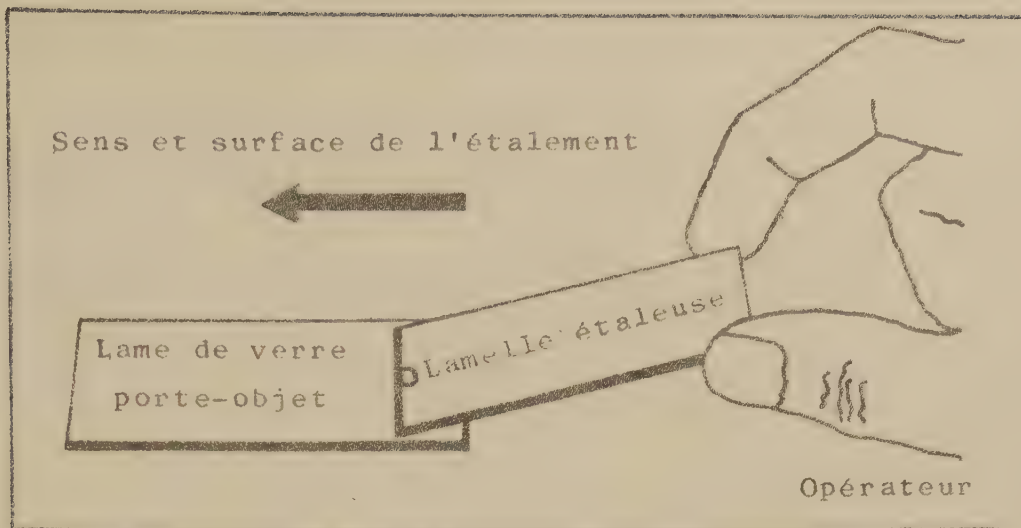
Pour être parfaitement lisible, un frottis de lait ne doit présenter qu'une couche de cellules.

L'étalement est d'autant plus mince qu'il a été effectué plus lentement et que l'angle de la lamelle et de la lame est plus petit.

La dessiccation immédiate du frottis par agitation à l'air est indispensable à la bonne conservation de la forme des cellules. Ne jamais chauffer pour dessécher la préparation.

Les frottis ainsi séchés se conservent longtemps, à condition de ne pas être fixés, mais la coloration des frottis diminue au fur et à mesure qu'ils vieillissent.

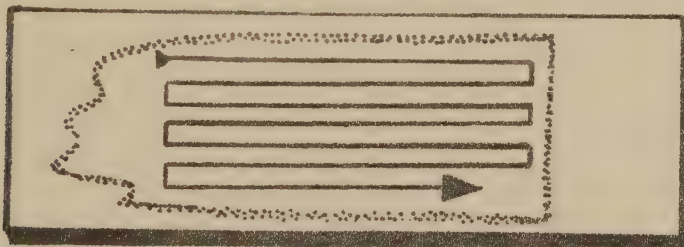
Après l'examen des frottis directement par microscopie photonique (objectif à immersion), nous constatons que d'innombrables globules gras tapissent la surface du frottis, mais qu'on ne peut observer que très peu ou pas de cellules.



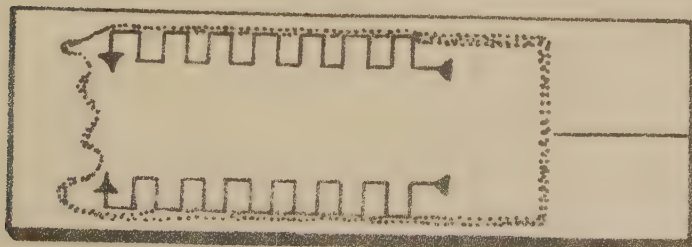
TECHNIQUE DE CONFECTION D'UN FROTTIS



Position des lame et lamelle vues de profil



EXPLORATION METHODIQUE D'UN FROTTIS
POUR ETABLIR LE LEUCO-GRAMME DU LAIT



Couche de cellules

De nos premières expériences, il ressort que :

- la rareté des cellules dans le frottis ne permet pas de les examiner au microscope
- un tel frottis est tellement couvert de millions de globules gras que les cellules éventuelles risquent de passer inaperçues
- les quelques rares cellules rencontrées sur le frottis ne sont pas suffisamment contrastées pour être facilement identifiables.

Donc l'observation des cellules du lait au microscope photonique nécessite trois mises au point :

- élimination des globules gras
- enrichissement du lait en cellules
- coloration des cellules.

C'est pour apporter des résolutions à ces trois points que nous effectuons les essais suivants,

CHAPITRE II

I - ELIMINATION DES GLOBULES GRAS POUR ETUDE CYTOLOGIQUE DU LAIT

A - Utilisation des solvants organiques

Afin de dégraisser, nous avons essayé quelques solvants organiques directement sur le lait et sur les frottis du lait.

1° - Dans huit tubes à essai, nous mélangeons 10 ml de lait entier, individuellement avec 10 ml de chacun des solvants organiques purs suivants :

- Alcool éthylique
- Hexane
- Ether sulfurique
- Chloroforme
- Xylène
- Benzène
- Acétone
- Glycérol

Les mélanges obtenus, bien homogénéisés par retournement des tubes, sont maintenus pendant trois heures à la chambre froide +4°C. Nous constatons que chacun de ces solvants dénature les protéines du lait et provoque une précipitation au fond du tube.

La confection des frottis à partir de tels mélanges se révèle donc très difficile et l'examen cytologique impossible.

2° - Après dessiccation des frottis, trois lames sont placées pendant une, deux et trois heures dans chacun des solvants organiques ci-dessus dans des tubes de Borrel. Les essais sont effectués à la température du laboratoire (20° C).

Les frottis ainsi traités sont successivement retirés des solvants, séchés et soigneusement examinés au microscope.

On observe que, d'une part, tous les solvants utilisés dégraisent les frottis de lait et d'autre part, le degré de dégraissage est

d'autant plus grand que le temps de contact des lames avec les solvants est plus long. Mais ce dégraissage, relativement élevé, va de pair avec une grave altération de la morphologie des cellules sur frottis, due à l'effet prolongé et brutal des solvants.

BOURGEOIS, (3) propose le mélange 1 V./2 V. de l'éther sulfurique et alcool éthylique pur, pour le dégraissage des frottis de lait. Cette méthode, pas plus que tous nos autres essais, ne nous a pas donné satisfaction.

Nous formulons donc trois critiques à l'égard de ces méthodes :

a) L'usage d'un solvant ne dégraisse que partiellement les frottis de lait

b) Les cellules de lait étalées sur lame de verre se décollent de leur support et sont partiellement entraînées par le solvant.

c) Dans les frottis ainsi dégraissés, les structures cellulaires sont souvent très abîmées.

B - Elimination des globules gras et enrichissement du lait en cellules par centrifugation

La plupart des auteurs (3, 7) utilisent la centrifugation pour recueillir les cellules du lait et éliminer les globules gras.

En 1908, RUSSEL et HOFFMAN, signalaient une augmentation du nombre de leucocytes dans le culot, lorsqu'ils effectuaient la centrifugation après chauffage du lait de 60 à 70° C.

Selon BOURGEOIS, le lait fraîchement traité est porté à une température de 45 à 50° C, puis rapidement refroidi et centrifugé à la vitesse de 3500 tours par minute pendant 10 minutes. BOURGEOIS pense que le chauffage est indispensable pour supprimer toute adhérence des leucocytes aux globules gras et obtenir la précipitation de la presque totalité des cellules dans le culot de centrifugation ; la couche de crème superficielle ne contiendrait plus alors qu'une quantité négligeable d'éléments figurés, ne pouvant influencer sur la sincérité des résultats. La température de 50° C ne doit pas, selon cet auteur, être dépassée ; au-dessus, si les leucocytes sont encore plus abondants dans les culots, ils sont, par contre, plus ou moins altérés et cet état est un obstacle à leur coloration et à leur intégrité morphologique, toute différenciation devient

alors difficile, sinon impossible.

II - CRITIQUE DE LA METHODE DE BOURGEOIS ET DISTRIBUTION DES LEUCOCYTES DANS LE LAIT CENTRIFUGE

Après la centrifugation du lait chauffé et refroidi, nous obtenons trois parties dans le tube à centrifuger :

- 1 - couches des globules gras (crème)
- 2 - lait écrémé
- 3 - culot

Pour vérifier l'efficacité de la méthode de BOURGEOIS, nous avons reproduit son protocole, puis nous avons effectué des frottis à partir de chacune des phases 1, 2 et 3.

Nous constatons que :

- le nombre de cellules présentes dans la couche des globules gras, au contraire de ce que pensait BOURGEOIS, est important et ne peut pas être négligé. De nos multiples expériences (une cinquantaine), on peut conclure aussi que plus la température du lait est élevée, plus le nombre de cellules "montées" avec la crème pendant la centrifugation est grand.
- le lait écrémé est totalement dépourvu de globules gras et de cellules.
- le culot est riche en cellules, mais il possède aussi beaucoup de globules gras. Donc la séparation totale cellules-globules gras n'est pas atteinte.

Ces cellules sont souvent morphologiquement altérées, leur identification est devenue difficile.

Nous attribuons ce mauvais état morphologique au chauffage préalable du lait. Retenons donc que le chauffage du lait à 50° C dénature et précipite une partie des protéines solubles du lait. Il conduit à un culot de centrifugation très visqueux, dont l'étude cytologique est presque impossible.

Or, pour la plupart de nos expériences, nous avons besoin de leucocytes du lait morphologiquement intacts et autant que possible biologiquement actifs. Devant la carence des méthodes précédentes, nous avons donc cherché à mettre au point une méthode de LEUCO-CONCENTRATION du lait, respectant ces impératifs. Et, en conséquence, nous

adoptons dès maintenant, comme règle, d'éviter tout chauffage du lait.

De plus, il nous a paru indispensable d'étudier et de connaître les globules gras du lait afin de pouvoir choisir comment les éliminer et obtenir un lait LEUCO-CONCENTRE.

III - STRUCTURE PHYSICO-CHIMIQUE DES GLOBULES GRAS DU LAIT

Un mm³ de lait renferme 2 à 6 millions de globules gras sous la forme d'une émulsion, et ils ont tendance à se réunir en grappes (5, 7). La dispersion des globules gras a, comme conséquence importante, qu'ils présentent une surface considérable ; les globules gras d'un litre de lait présentent une surface d'environ 80 m² (1). Les globules ne paraissent pas être physiquement homogènes. A l'examen en lumière polarisée, on a pu montrer la présence de cristaux dirigés tangentielle-ment à la surface globulaire.

Ces globules sont entourés d'un film protecteur de nature lipo-protéique ou "membrane". Ce film protecteur a pu être séparé en deux fractions, l'une soluble, l'autre insoluble dans les solvants aqueux (4). On peut, d'autre part, distinguer dans la membrane une face externe et une face interne. Cette dernière, de nature phospholipidique, est composée principalement de lécithines et de céphalines.

La phosphatase alcaline est concentrée dans la fraction protéique soluble et la xanthine-oxydase dans la fraction protéique insoluble de la membrane des globules gras (2).

La partie centrale des globules gras contient surtout des glycérides à bas point de fusion, riches en acide oléique et liquides à la température ambiante, alors que la périphérie, au contact de la membrane, est constituée par des glycérides à indice d'iode très bas et à point de fusion élevé, solides à la température ambiante.

La multitude des globules gras dans le lait favorise souvent le rapprochement et parfois la soudure de ces globules. A cet égard, on distingue en général deux types de groupements :

- Il peut y avoir simple juxtaposition, les globules formant des grappes qui montent beaucoup plus vite à la surface du lait que des globules isolés. C'est à ce type de groupement qu'est due la montée normale de la crème et nous avons montré que ces grappes de globules entraînent des leucocytes à la surface du lait.

Les agglutinines figurant parmi les lacto-globulines dans la constitution de la membrane des globules gras sont l'un des facteurs qui accélère leur rassemblement en grappes.

- Dans un second type de groupements, la membrane se rompt et le globule perd son individualité. Le rassemblement des globules devient irréversible. Le phénomène se produit par exemple par refroidissement énergétique ou par une lécithinase microbienne (*Bacillus Cereus*, *Bacillus mycoides*) qui hydrolise la lécithine de la membrane globulaire (8 a).

Certains glycérides cristallisent et la partie centrale des globules se rétracte en entraînant la rupture de la membrane. Les glycérides à bas point de fusion, restés liquides, exsudent et les globules plus ou moins altérés s'agglomèrent en petits granules.

Nous allons maintenant chercher à étudier de façon plus précise l'influence du chauffage sur la morphologie des globules gras du lait.

IV - ETUDE DU COMPORTEMENT MORPHOLOGIQUE DES GLOBULES GRAS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE DU LAIT

A partir d'un même échantillon du lait entier, (fraction du milieu de la traite matinale), bien homogénéisé, on prélève cinq fois 100 ml et on les verse séparément dans cinq ballons jaugés, étiquetés A, B, C, D, E.

On procède aux traitements suivants :

- A maintenu à température ambiante (20° C)
- B chauffé jusqu'à + 55 ° C et maintenu à cette température, dans un bain-marie pendant 20 minutes
- C refroidi jusqu'à + 2° C et maintenu à cette température, à la glacière pendant 20 minutes
- D d'abord chauffé à + 55° C pendant 20 minutes et ensuite refroidi à + 2° C pendant 20 minutes
- E d'abord refroidi à + 2° C pendant 20 minutes et ensuite chauffé à + 55° C pendant 20 minutes.

Les traitements envisagés de chaque échantillon aussitôt terminés, les ballons sont bien homogénéisés par cinq retournements.

De chaque échantillon, plusieurs frottis sont faits, ils sont fixés et colorés et très rapidement examinés et explorés au microscope avec l'objectif à immersion.

- Dans l'échantillon A, les globules gras se présentent parfois grands et regroupés ou parfois petits et isolés ; les colonies ne sont pas grandes.
- Dans l'échantillon B, les globules gras sont nettement regroupés en grappes et les colonies sont assez grandes ; la forme individuelle de chaque globule semble être grande (planche I, photo I₁).
- Dans l'échantillon C, les globules gras sont plus petits que ceux de B, ils sont dispersés et isolés ; on ne voit pas de grappe de globules (planche I, photo I₂).
- Dans l'échantillon D, la forme et la position des globules gras sont similaires à celles de C. (planche I, photo I₃).
- L'échantillon E présente un aspect semblable à celui de B en ce qui concerne la morphologie des globules gras (planche I, photo I₄).

Nous avons répété cette expérience trois fois et chaque fois sur un lait provenant d'une vache différente. Les résultats obtenus sont les mêmes.

En conclusion :

a) La forme et les "propriétés de membrane" des globules gras du lait dépendent de la température du lait.

b) La température élevée favorise le regroupement des globules gras parce qu'elle modifie leurs "propriétés de membrane". Des expériences effectuées à 90 ou à 100° nous ont permis d'observer le rapprochement et la soudure de petits globules pour en former de plus grands. C'est pourquoi, dans le lait chauffé, les globules gras sont individuellement plus grands et plus regroupés en grappes que dans le lait refroidi.

Cette conclusion ne nous paraît pas douteuse et s'oppose à l'hypothèse émise (8 b) concernant la dénaturation des agglutinines superficielles des globules gras pendant le réchauffage du lait à une température supérieure à 70° C qui diminuerait leur tendance à se regrouper en grappes.

c) Pour expliquer les résultats obtenus en C et D, rappelons que le refroidissement entraîne la cristallisation de certains glycérides se

trouvant à la partie périphérique des globules ; ceux-ci se rétractent en provoquant la rupture de leur membrane. Les glycérides à bas point de fusion, restés liquides, exsudent et les globules plus ou moins altérés s'agglomèrent en petits granules.

C'est pourquoi, dans le lait refroidi, nous trouvons les globules gras relativement petits et dispersés. Ils sont moins susceptibles d'entraîner les leucocytes.

Cette constatation est une raison supplémentaire d'effectuer la leucoconcentration à froid.

d) Dans cette expérience, les modifications de forme et les propriétés de membranes des globules gras semblent partiellement réversibles.

Après avoir constaté que la séparation leucocytes-globules gras par centrifugation est possible sur du lait refroidi, nous avons tâtonné pour rendre optimales la durée et la vitesse de centrifugation.

En suivant avec précision la technique de leucoconcentration décrite ci-dessous, il est possible d'obtenir la totalité des leucocytes sous forme intacte d'un échantillon de lait à examiner.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ALLAIS C. - Sciences du lait, 2e éd., S.E.P., Paris, (1965), p.72
- 2 - BRUNNER J.B. - J. Dairy Sci., (1962), 45, 943
- 3 - BOURGEOIS E.A.G. - Th.Doct.-vét., Paris, (1927), p.37
- 4 - HERALD C.T. et BRUNNER J.B. - J. Dairy Sci., (1957), 40, 948
- 5 - JACQUET J. et THEVENOT R. - Le lait et le froid, éd. Baillière, Paris, (1961), p.46
- 6 - PHIPPS L.W. et NEWBOULD F.H.S. - J. Dairy Res., (1966), 33, 51
- 7 - TOLLE A., ZEIDLER H. et HEESCHEN W. - Milchwissenschaft, (1966), 21, 93
- 8 - VEISSEYRE R. - Techniques laitières, 2e éd. Maison Rustique, Paris, (1965), PP. (a) 7, (b) 265.

PLANCHE I

I - PHOTOGRAPHIES : (X 900)

- (1) Dans le lait chauffé, les globules gras sont GRANDS et REGROUPES
- (2) Dans le lait refroidi, les globules gras sont PETITS et DISPERSES
- (3) Dans le lait refroidi puis chauffé, les globules gras sont REGROUPES
- (4) Dans le lait chauffé puis refroidi, les globules gras sont DISPERSES

+ + +

II - PHOTOGRAPHIES : (X 1600)

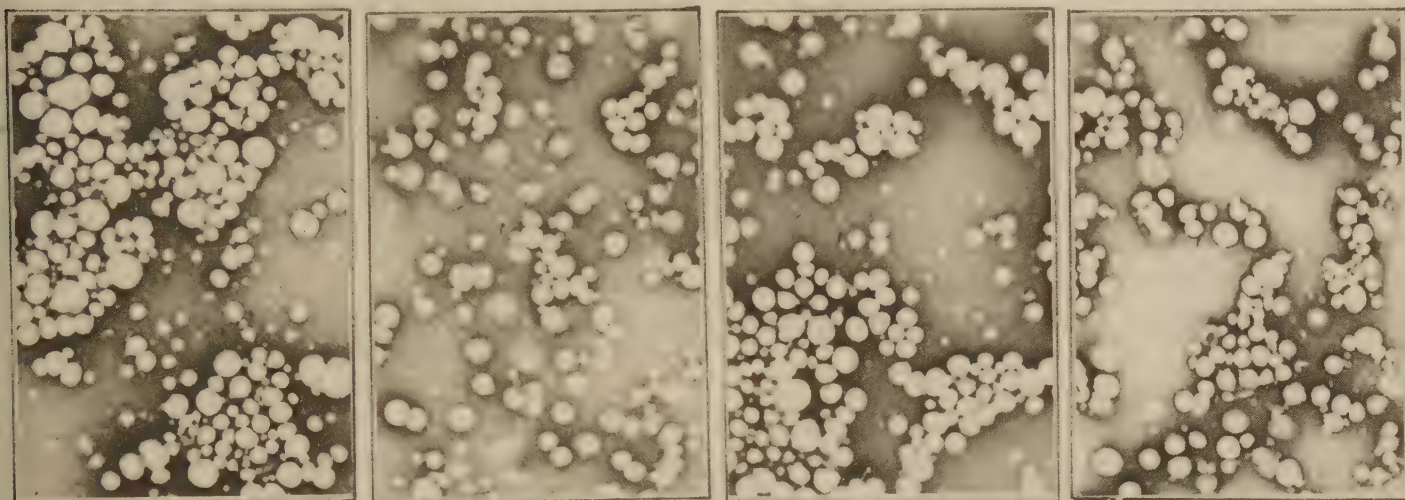
- (1) Un polynucléaire neutrophile du lait (noyau à 3 lobes), dans un frottis non dégraissé
- (2) Un petit lymphocyte du lait, (3) un polynucléaire neutrophile du lait (noyau à 4 lobes), dans des frottis partiellement dégraissés par les solvants organiques
- (4) Un polynucléaire neutrophile du lait (noyau à 4 lobes) dans un frottis de culot, parfaitement dégraissé selon notre méthode de LEUCO-CONCENTRATION .

+ + +

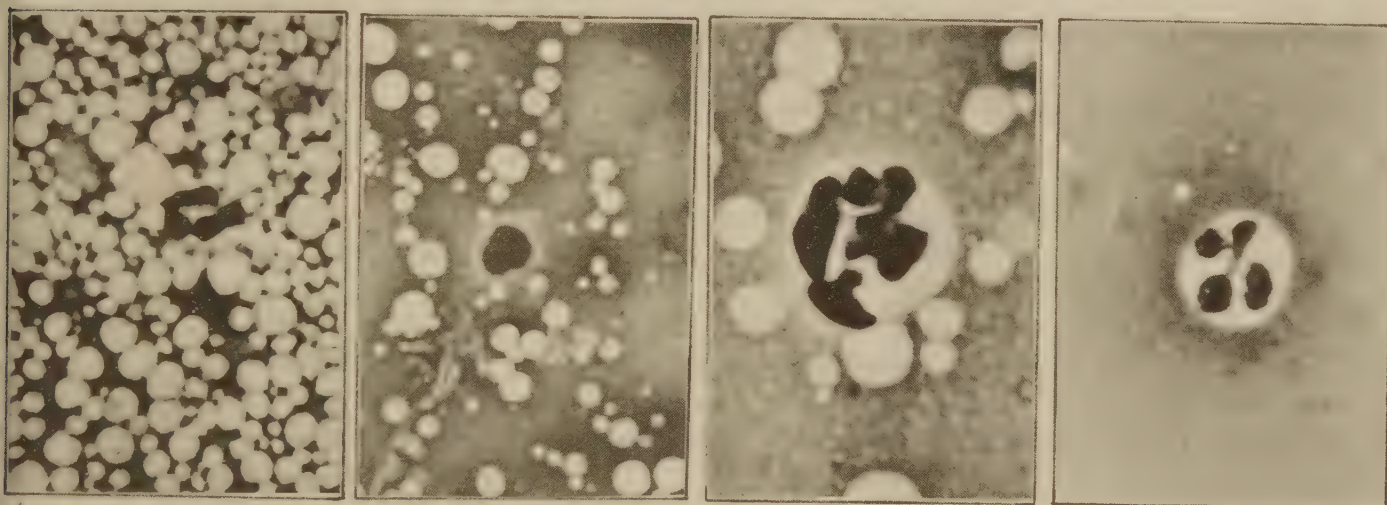
III - PHOTOGRAPHIES : (X 1200)

- (1) Aspect microscopique des globules gras du lait de FEMME
- (2,3,4) Frottis de culot LEUCO-CONCENTRE du lait de FEMME
(les corps en croissant sont les reliquats cytoplasmiques des lymphocytes dont leur noyaux sont lysés et abandonnés).

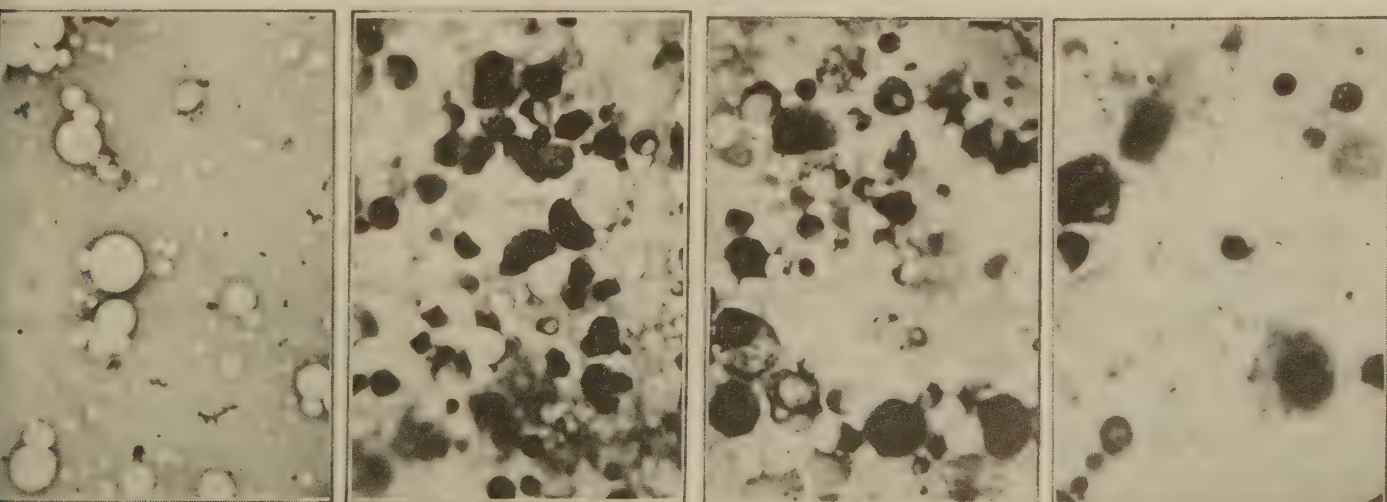
I - Variations de la forme et des propriétés de la paroi
des globules gras en fonction de la température du lait.



II - Elimination des globules gras et LEUCO-CONCENTRATION DU LAIT.



III - LAIT de FEMME et ses leucocytes.



CHAPITRE III

I - METHODE DE LEUCO-CONCENTRATION DU LAIT

Le lait frais de fin de traite est bien homogénéisé et refroidi aussitôt à $+2 - +4^{\circ}\text{C}$. Il est maintenu pendant 20 minutes à cette température.

Il est homogénéisé à nouveau par retournement du flacon, réparti dans des tubes à centrifuger de 10 ml en polystyrène, gradués en dixièmes de ml, à fond cône (réf. a.Semadeni + CO., Bern).

Les tubes sont placés dans une centrifugeuse réfrigérée à $+2^{\circ}\text{C}$ et ils sont centrifugés de 6000 à 15000 g pendant 15 minutes.

La couche des globules gras et le lait écrémé sont aspirés à l'aide d'une micro-pipette reliée à une trompe à eau. On s'arrête lorsqu'il reste très peu de lait écrémé au-dessus du culot. Ceci correspond à un volume de 0,5 ml.

Le culot est homogénéisé par un mince fil de verre à extrémité arrondie.

Ainsi que nous le démontrons plus loin, cette suspension contient la totalité des leucocytes. Le rapport de concentration est de 20. Nous utiliserons dans la suite du travail soit le culot pour les frotis et la microscopie électronique, soit la suspension leuco-concentrée pour les numérations.

DISCUSSION

- 1 - Dans nos expériences, nous avons constaté que le lait de fin de traite est plus riche en leucocytes que le lait prélevé au début ou au milieu de la traite.
- 2 - Les tubes à centrifuger utilisés sont choisis en matière plastique en raison de leur paroi peu mouillable. Les tubes en verre peuvent être utilisés pour la leuco-concentration du lait, mais à condition qu'ils soient siliconés au préalable.

En effet, une étude a montré (3) que les leucocytes du sang sont retenus par des perles de verre. Les éosinophiles sont les plus retenus, puis les granulocytes neutrophiles, tandis que les mononucléaires ne montrent pas beaucoup de tendance à se fixer sur la surface des perles. Les neutrophiles sont les plus difficiles à éluer.

- 3 - L'utilisation de centrifugeuses réfrigérées est nécessaire pour éviter le chauffage du lait au cours de la centrifugation. De plus, une température élevée favorise et accélère l'autolyse des leucocytes.

Pour nos expériences, nous avons utilisé ou la centrifugeuse préparative SPINCO, modèle L 50, rotor n° 4, réfrigérée à + 2°C, ou la centrifugeuse MARTIN CHRIST UNIVERSAL JUNIOR 1500 dans la chambre froide à + 4° C.

- 4 - Nous constatons qu'une centrifugation de durée inférieure à 15 mn ou à une accélération inférieure à 6000 g ne se révèle pas suffisante pour obtenir la séparation totale globules gras-leucocytes. La couche supérieure contient en effet, dans ce cas, des leucocytes observables et le culot contient aussi des petits globules gras visibles au microscope. Par contre, une centrifugation prolongée plus de 15 mn ou à une accélération supérieure à 15 000 g assurerait théoriquement la séparation totale leucocytes-globules gras, mais dans ce cas, les leucocytes sont morphologiquement altérés, surtout les polynucléaires plus fragiles que les mononucléaires.
- 5 - La centrifugation de lait réfrigéré (+ 2° C), pendant 15 minutes à des accélérations comprises entre 6000 et 15 000 g donne de bons résultats. On choisira par exemple 10 000 g ou 12 000 g. Dans ces cas :

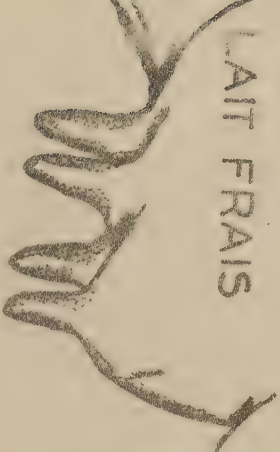
- la totalité des cellules du lait se trouve dans le culot
- le culot contient très peu de globules gras, le lait écrémé et la crème sont dépourvus de cellules
- les leucocytes ainsi obtenus sont en bon état morphologique.

II - PURIFICATION ET LAVAGES DES LEUCOCYTES DU LAIT

Le culot leuco-concentré obtenu est riche en cellules, mais il contient aussi de très nombreux petits globules gras qui ne sont pas visibles au microscope, même à fort grossissement. (En microscopie électronique toutefois, nous avons pu observer ces petits

LEUCO-CONCENTRATION DU LAIT

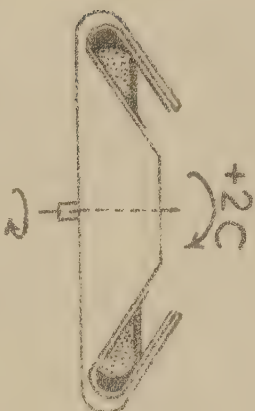
LAIT FRAIS



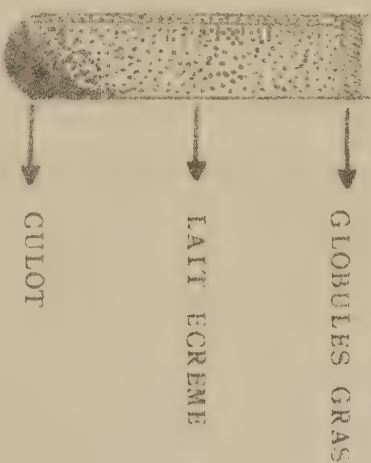
FIN DE LA TRAITE
RICHE EN LEUCOCYTES

REFROIDIR

2 - 4 C°



CENTRIFUGATION
REFRIGEREE (+2 C°)
6000 - 15000 g
15 MINUTES



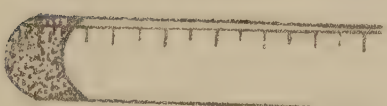
ELIMINATION DES GLOBULES GRAS,
LAIT ECREME PAR UNE PIPETTE
RELIEE A TROMPE A EAU
VIDE 18 cm. DE MERCURE



MICROSCOPIE
PHOTONIQUE

MICROSCOPIE
ELBCTRONIQUE

CULOT
+
SERUM PHYSIOLOGIQUE
= 1 mL.



SUSPENSION
LEUCO-CONCENTRE
(NUMERATION)

globules gras, dont le diamètre varie de 1000 à 7000 Å).

Ces globules gras étant très petits, leur force ascensionnelle très faible, ils ne peuvent pas vaincre la viscosité du milieu, ne montent pas à la surface pendant la centrifugation et, de ce fait, restent dans le culot.

Parfois, le culot est très visqueux ; ce qui rend difficile la confection des frottis et l'examen cytologique devient impossible.

Nous pensons que des micelles de caséine (+) sont entraînées dans le culot au cours de la centrifugation et provoqueraient ainsi cet accroissement de viscosité.

Les leucocytes ont une surface cellulaire très active ; nous pensons donc qu'ils peuvent fixer des protéines colloïdales. La colorabilité des leucocytes du lait est toujours moins bonne que celle des leucocytes du sang : celle-ci pourrait être attribuable aux fines couches des protéines qui ont recouvert la surface des leucocytes dans le lait.

Afin d'éliminer les petits globules gras, les micelles de caséine et de supprimer ces protéines fixées, nous procéderons aux expériences suivantes :

A - Technique de concentration des leucocytes du lait sur Filtre Millipore

Filtres Millipores :

Ces filtres sont de minces membranes cellulosesques présentées sous un diamètre de 47, 37, 25 ou 13 mm et sous une gamme de porosité, classées de 0,01 à 8 microns.

Les pores, de même taille pour un filtre considéré, sont uniformément répartis et occupent environ 80 % de sa surface.

Ils se comportent donc comme des cribles et il suffit de

(+) Les micelles de caséine dans le lait se trouvent sous forme de particules sphériques dont la dimension n'est pas uniforme. Dans le lait de vache, les micelles ont, en général, un diamètre compris entre 500 et 1000 Å (ALLAIS C.)

veiller au départ au choix de la porosité, en fonction de la taille des cellules à examiner. Ces filtres doivent recevoir les cellules sur une face déterminée, indiquée par un repère.

Choix du filtre :

Après la mesure du diamètre apparent des leucocytes du lait au microscope (+) , nous constatons que la très grande majorité des leucocytes ont un diamètre supérieur à 5 microns, c'est pourquoi nous avons choisi un filtre Millipore de porosité 5 microns et de diamètre 47 mm en Téflon (Millipore, réf. MITEX, LSW 0047).

Donc la filtration du culot leuco-concentré sur le filtre ainsi choisi doit éliminer toutes les particules (petits globules gras, micelles de caséine, micro-organismes) dont le diamètre est égal ou inférieur à 5 microns et les leucocytes doivent être seuls retenus à la surface du filtre.

Fixation :

La filtration du culot leuco-concentré doit être effectuée le plus rapidement possible. Pour obtenir une meilleure conservation des éléments cellulaires, nous pratiquons une fixation à + 4° C, à parties égales du culot avec une solution de formol à 10 % et de saponine à 2 % dans le sérum physiologique (ClNa 0,9 % dans l'eau distillée) (1).

Nous soulignons l'importance du moment de la fixation. Il doit avoir lieu le plus tôt possible après la préparation de la suspension leuco-concentrée. Une fixation trop tardive (dépassant parfois 24 h) a souvent conduit à un matériel lysé et les leucocytes sont alors ininterprétables. Une fixation immédiate, même prolongée jusqu'à 24 h à + 4° C avant la filtration, a permis la conservation des leucocytes. Le mélange du culot et du fixateur sera homogénéisé soigneusement et sera dilué dix fois avec le sérum avant la filtration.

Filtration :

La filtration s'effectue sur un Buchner en Pyrex dont le col est composé de deux parties, la partie inférieure est munie d'un support de 47 mm de diamètre, sur laquelle repose le filtre ; l'appareil est placé au-dessus d'une fiole à vide reliée à la trompe à eau (18 cm de mercure).

(+) La méthode et les résultats de cette mesure seront exposés ultérieurement.

Coloration :

Une fois le filtre chargé des leucocytes, il est enlevé de l'appareil et déposé sur un buvard, afin de le sécher, les cellules restant au-dessus.

Le filtre séché est coloré pendant cinq minutes dans une boîte de Pétri avec le colorant GIEMSA. R (R.A.L.), puis lavé successivement dans trois bains d'eau distillée, tamponnée à pH 7. Afin de prévenir toute perte de cellules, les passages successifs d'un bain à l'autre doivent être faits très soigneusement. On sèche le filtre sur un papier buvard dans l'air et à la température de laboratoire.

Montage :

Le problème est de réaliser une adhérence parfaite du filtre tant à la lame qu'à la lamelle. Car toute trace d'air gêne la lecture. Il est donc préférable d'utiliser un baume épais. Souvent, nous avons coupé le filtre en deux ou trois petites parties afin d'utiliser des lames de dimensions normales. Le montage du filtre entre lame et lamelle par huile à immersion habituelle (huile de cèdre, $n = 1,55$) nous a donné un résultat satisfaisant.

Lecture au microscope :

Ces filtres ainsi montés sont prêts pour l'exploration ; mais, pour améliorer les conditions de lecture, il faut augmenter l'intensité d'éclairage.

Les membranes sont claires : les leucocytes sont répartis sur leur surface et les détails cellulaires sont préservés.

Conclusion :

Nous soulignons l'intérêt que présente cette méthode de concentration, mais aussi ses inconvénients.

Avantages :

Les membranes sont généralement riches en leucocytes et la morphologie des cellules est parfaite.

Inconvénients :

1° - La filtration, en raison du colmatage des microporosités du filtre par les globules gras, dure longtemps (10 ml de culot leuco-concentré, dilué par du sérum physiologique, ont été filtrés en 14 h. Même l'augmentation du vide n'accélère pas la filtration).

2° - Sur le filtre, l'identification des différentes catégories leucocytaires est difficile.

3° - Après quelques mois, la coloration des cellules est moins bien conservée que sur les frottis et une nouvelle lecture est impossible.

Nous avons dû abandonner cette méthode au profit de l'étalement des leucocytes sur une lame.

B - Lavage du culot leuco-concentré

On ajoute 5 ml de sérum physiologique à + 4° C sur le culot dans le tube à centrifuger. Après l'homogénéisation du culot dans le sérum, on centrifuge à 10000 g, pendant 15 minutes, à + 4° C.

Avec le surnageant, une grande partie des petits globules gras sera éliminée. Ce lavage des leucocytes par du sérum améliore leur colorabilité, mais il ne faut pas le répéter.

C'est ce dernier culot leuco-concentré et lavé que nous utiliserons dans la suite.

III - COLORATION DES FROTTIS

Pour colorer les frottis des leucocytes du lait, nous avons utilisé les quatre méthodes de coloration suivantes :

- 1 - coloration combinée de MAY-GRUNWALD et GIEMSA dite coloration panoptique de PAPPENHEIM
- 2 - coloration au GIEMSA seul (5)
- 3 - coloration au Bleu de méthylène phénique (4)
- 4 - coloration avec la solution aqueuse de safranine (2).

La meilleure coloration des frottis des leucocytes du lait est obtenue par la méthode panoptique de PAPPENHEIM ; mais la durée de la coloration est assez longue (pour la plupart de nos essais, nous avons utilisé cette technique).

Les trois autres méthodes de coloration sont relativement

rapides mais la qualité de coloration n'est pas aussi satisfaisante que dans la méthode de PAPPENHEIM.

IV - EXAMEN DES FROTTIS AU MICROSCOPE

Dans un premier temps, cet examen se fait en utilisant un objectif à sec donnant un grossissement moyen, ceci dans le but d'apprécier la répartition des différents types cellulaires et d'évaluer grossièrement leurs proportions respectives.

Une seconde observation, plus rigoureuse, utilisera l'objectif à immersion, indispensable à une bonne analyse cytologique.

Nos expériences sont effectuées par un microscope photonique "WILD M 20" muni des objectifs à immersion et à contraste de phase.

Un appareil de photographie "EDIXA" a été adapté sur ce microscope. Nos prises de vues au microscope sont effectuées sur films Panatomic-X Kodak (blanc et noir) et Kodachrome II A (couleur).

V - CONSERVATION DES FROTTIS

Après examen, l'huile à immersion déposée sur frottis est lavée au Xylol. Les frottis ainsi nettoyés sont séchés à l'air et conservés à sec, à l'abri de la poussière.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - BEAUMER M.M. et NUOVO V.M. - Archives d'anatomie pathologie, (1967), 15, n° Hors Série, 50
- 2 - BESSIS M. - Traité de cytologie sanguine, éd. Masson, Paris, (1954), p. 67
- 3 - FICHTELIUS K.E. et JOHANSSON M.J. - Acta haemat., (1964), 32, 183
- 4 - GAUTIER J.A., RENAULT J., PELLERIN F. - Fiches techniques d'analyse bromatologique, éd. S.E.D.E.S., Paris, (1961), Le lait, p. 23
- 5 - MALLARME J. et MESSERSCHMITT J. - Les cahiers d'hématologie, éd. S.E.D.E.S., Paris, (1948), p. 61

ANNEXE DU CHAPITRE III

COLORATION DES FROTTIS DE LEUCOCYTES DU LAIT

Principe :

Les colorants basiques sont des électrolytes dont l'ion colorant est un cation. Ex. : le bleu de Toluidine est le chlorhydrate de triméthyl-thionine, seul le cation Triméthyl-thionine est colorant.

Les colorants basiques colorent les substrats "Basophiles", lesquels sont acides. Les noyaux des leucocytes sont colorés par les colorants basiques. Les colorants acides sont des électrolytes dont l'ion colorant est un anion. Ex. : l'éosine est le Bromofluorescéinate de sodium, seul l'anion bromofluorescéinate est colorant.

Les colorants acides colorent les substrats "Acidophiles", qui sont souvent basiques. Les cytoplasmes des leucocytes sont colorés par les colorants acides.

Certains organites cellulaires sont colorés à la fois par les colorants acides et par les colorants basiques, ils sont dits "Neutrophiles".

C'est à la fin du 19^e siècle que le savant allemand Paul EHRLICH découvrit l'emploi des colorants neutres obtenus par saturation d'un colorant acide par un colorant basique. Il classa les leucocytes polynucléaires du sang, selon l'affinité tinctoriale des granulations de leur cytoplasme, en trois catégories :

- Neutrophiles
- Acidophiles = Eosinophiles
- Basophiles

Cependant, il convient d'insister sur le fait que l'affinité due au pH n'est pas la seule à commander l'électivité des colorants cytologiques. PAPPENHEIM a préconisé l'emploi successif du May-Grünwald et Giemsa pour colorer tous les organites cellulaires.

C'est la méthode panoptique universellement utilisée à l'heure actuelle pour la coloration des éléments figurés du sang.

A - Technique de la coloration au MAY-GRÜN WALD et GIEMSA (M.-G., G.)

1 - Fixation :

Verser sur la lame séchée non fixée 20 gouttes de liquide de May-Grünwald de manière à bien la recouvrir pour éviter l'évaporation de l'alcool (solvant). Laisser agir pendant trois minutes.

2 - Ajouter 20 gouttes d'eau distillée tamponnée à pH 7, mélanger en inclinant la lame en tous sens. Laisser agir deux minutes.

3 - Coloration au GIEMSA dilué

Rejeter le May-Grünwald et, sans laver, verser du Giemsa dilué fraîchement préparé (1 ml. ou environ 40 gouttes de Giemsa dans 20 ml. d'eau distillée neutre).

Laisser colorer pendant 20 minutes.

(Les colorants May-Grünwald et Giemsa nous sont fournis par F.M.C. R.A.L., Paris).

Giemsa existe sous les marques R. et L., la première donnant une coloration intense et rapide (10 minutes), la deuxième une coloration lente (20 minutes).

4 - Lavage

Laver sous le jet d'eau d'une pissette.

5 - Séchage

Il se fait soit par égouttage, soit par ventilation ; le séchage entre deux feuilles de papier JOSEPH risque d'érailer le frottis.

Ne jamais chauffer le frottis.

Remarques :

1 - L'eau distillée employée doit être tamponnée à pH 7 suivant la formule :

- | | |
|---|----------|
| a - Solution aqueuse à 33,5 g. pour 1000 ml. de | |
| Phosphate Monopotassique ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) | 10 ml. |
| b - Solution aqueuse à 75 g. pour 1000 ml. de | |
| Phosphate disodique (PO_4HNd_2 , 12 H_2O) | 20 ml. |
| c - Eau distillée, q.s.p. | 1000 ml. |

2 - Avec la coloration de M.-G, G., les leucocytes du lait sont colorés ainsi :

- le noyau des leucocytes est violet-foncé
- le cytoplasme des mononucléaires est bleu-franc
- le cytoplasme des polynucléaires est blanc-jaunâtre ou incolore
- les granulations cytoplasmiques des neutrophiles sont gris-violet
- les granulations cytoplasmiques des basophiles sont bleu-noir et celles des éosinophiles sont jaune orangé vif.

B - Technique de coloration au GIEMSA seul

1 - Fixer à l'alcool éthylique absolu pendant trois minutes.

2 - Rejeter l'alcool, sans laver, colorer vingt minutes avec Giemsa dilué fraîchement préparé (1 ml. ou environ 40 gouttes de Giemsa dans 20 ml. d'eau distillée neutre).

3 - Laver, sécher.

C - Technique de coloration au Bleu de Méthylène Phénique

Réactifs :

R.I. - Bleu de Méthylène Phénique ;

- Bleu de Méthylène pour bactériologie.....	10 g.
- Phénol officinal	10 g.
- Alcool éthylique 95°	50 ml.

laisser en contact pendant 48 heures dans un flacon bouché
à l'émeri, puis ajouter :

- eau distillée	450 ml.
-----------------------	---------

Filtrer au moment de l'emploi.

R.II. - Alcool éthylique à 60°

R.III. - Alcool éthylique, éther sulfurique V/V à parties égales.

Coloration

- 1 - Fixer les frottis séchés à l'aide du mélange alcool-éther (R.III) pendant deux minutes.
- 2 - Colorer au Bleu de Méthylène (R.I.) pendant cinq minutes.
- 3 - Rejeter le Bleu de Méthylène et verser de l'alcool à 60°, laisser agir une minute.
- 4 - Laver à l'eau et sécher.

D - Technique de coloration à la solution aqueuse de safranine

Réactifs :

- SAFRANINE (produit R.A.L.)	5 g.
- eau distillée	500 ml.
- Mélanger et filtrer.	

(On peut utiliser également la solution de Safranine à 1 % dans l'alcool éthylique à 45°).

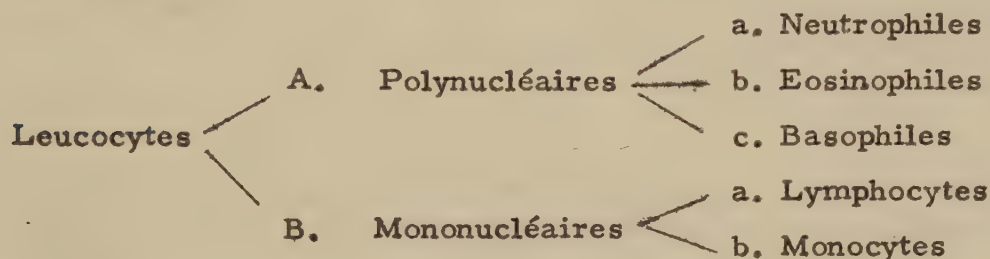
Coloration :

- 1 - Recouvrir les lames séchées avec la solution de Safranine, laisser agir dix minutes.
- 2 - Laver et sécher.

CHAPITRE IV

I- DESCRIPTION DES LEUCOCYTES DU LAIT

Aujourd'hui, les hématologistes, presque unanimement acceptent la classification ci-dessous pour les leucocytes normaux dans le sang :



Dans le lait, nous avons observé toutes les figures leucocytaires déjà décrites dans le sang, sauf les polynucléaires basophiles. De plus, les polynucléaires éosinophiles sont toujours extrêmement rares dans le lait.

II - AFFINITE TINCTORIALE ET MORPHOLOGIE DES LEUCOCYTES DU LAIT

Sur le frottis coloré par la méthode (May-Grünwald et Giemsa), les leucocytes du lait présentent les caractéristiques suivantes : (planche II)

Polynucléaires neutrophiles

Cellules arrondies de 12 microns de diamètre, ayant un cytoplasme incolore criblé de très fines granulations rose violacé relativement peu serrées, à noyau très polymorphe violet foncé. Ces leucocytes sont aisément reconnaissables dans les frottis de lait.

Polynucléaires eosinophiles

Très rares dans le lait, reconnaissables à leurs granulations rouge brique ou orangé, souvent serrés dans le cytoplasme dissimulant en partie le noyau. Le noyau est violet très foncé.

Lymphocytes

De diamètre 8 microns, arrondis, constitués par une mince frange de cytoplasme bleu clair (petit lymphocyte) ou d'une frange de cytoplasme plus importante (grand lymphocyte) et un volumineux noyau bleu foncé riche en chromatine.

Monocytes

De diamètre 16 microns, avec un noyau violet très foncé, parfois excentrique, avec une chromatine généralement filamenteuse; le cytoplasme est gris-bleu.

Tels sont sommairement décrits les divers leucocytes dont nous aurons à établir les proportions dans le lait.

Nous rencontrons très rarement des cellules épithéliales dans nos observations et elles ne nous semblent pas, pour cette raison, présenter d'intérêt ici.

III - MESURE DU DIAMETRE APPARENT DES LEUCOCYTES DU LAIT

Etalonnage du microscope

Il est nécessaire de disposer d'un oculaire de mesure avec micromètre-oculaire et d'un micromètre-objet qui permet de déterminer en microns la valeur d'un intervalle du micromètre-oculaire. On se sert de la formule suivante :

$$M = \frac{b \cdot E}{a}$$

M = valeur micrométrique

b = nombre d'intervalles du micromètre-objet

a = nombre d'intervalles du micromètre-oculaire

E = longueur en microns d'un intervalle du micromètre-objet

Cet étalonnage doit être répété pour chaque système optique (14).

Nous avons déterminé le diamètre individuel de chaque

PLANCHE II

Lymphocytes :

- 1, 2, 3 = Lymphocytes entourés des globules gras
(grossissement : x 1600) dans un frottis
non dégraissé.

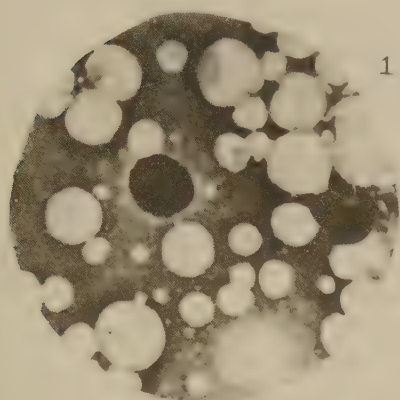
Monocytes :

- 1 = petit monocyte, entouré des globules gras,
dans un frottis non dégraissé, x 1600
- 2 = petit monocyte dans un frottis dégraissé, x 1600
- 3 = gros monocytes, x 2300

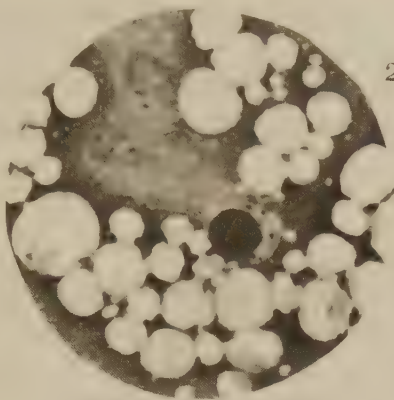
Polynucléaires :

- 1, 2 = Polynucléaires neutrophiles aux noyaux
non segmentés, x 2200
- 3,4,5,6 = Polynucléaires neutrophiles aux noyaux
polylobés, x 2200, x 2400, x 2400, x 1600

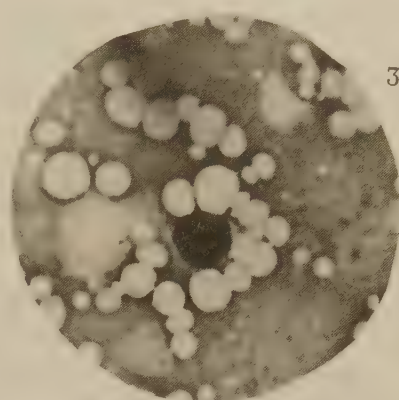
LYMPHOCYTES :



1

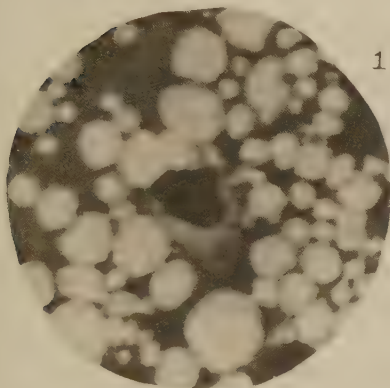


2



3

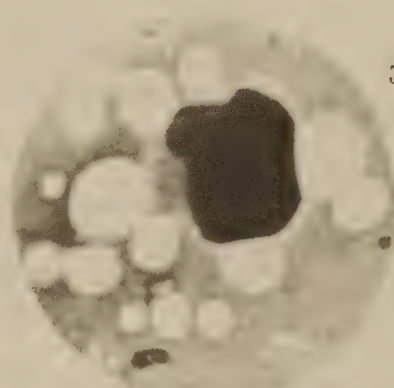
MONOCYTES :



1

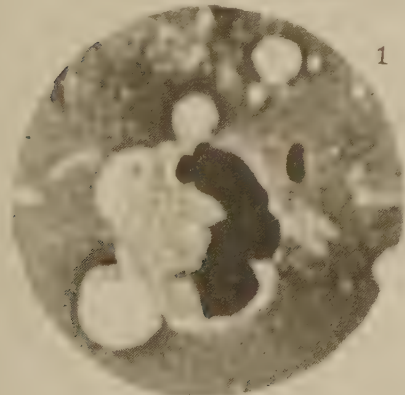


2

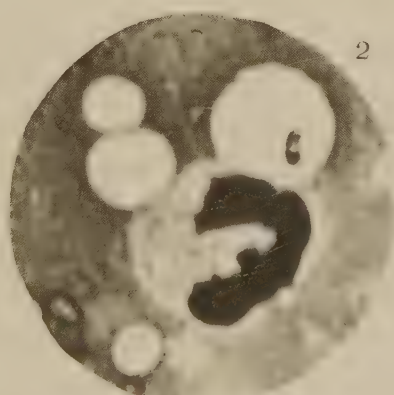


3

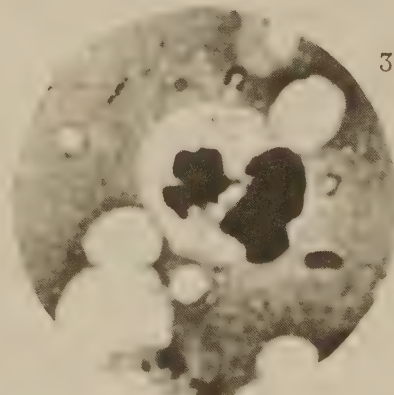
POLYNUCLEAIRES :



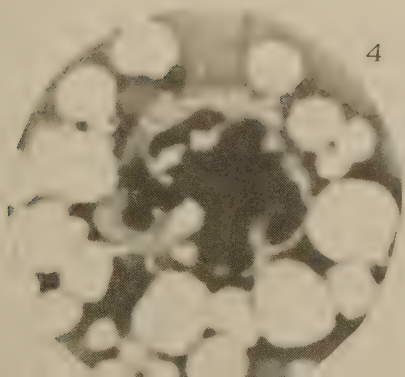
1



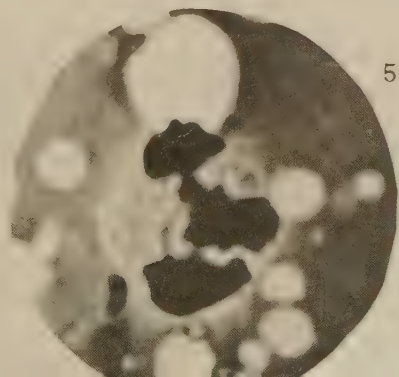
2



3



4



5



6

catégorie de leucocytes du lait, sur plusieurs frottis, très soigneusement confectionnés et colorés par la méthode de PAPPENHEIM, au microscope, muni d'un micromètre-oculaire que nous avons étalonné auparavant par l'intermédiaire d'un micromètre-objet dont la graduation était connue.

Technique

Avec un grossissement constant, la valeur en microns d'une division de l'échelle du micromètre oculaire une fois calculée, on mesure directement le diamètre apparent des globules gras et des leucocytes de forme arrondie en faisant coïncider l'un de ces diamètres avec l'échelle du micromètre-oculaire.

Pour les leucocytes de forme non arrondie, nous avons mesuré le plus petit et le plus grand diamètre de chaque élément pour faire la moyenne des résultats.

Afin de déterminer le diamètre moyen des différentes catégories leucocytaires, nous avons mesuré le diamètre de cinquante éléments de chaque lignée leucocytaire, ainsi que les globules gras, et nous avons calculé les moyennes de ces résultats.

Leucocytes :		Diamètre apparent en microns	
		Moyens	Extrêmes
1 - Polynucléaires		12,2	7,2 à 18
2 - Mononucléaires	lymphocytes	8,7	3,6 à 19,5
	monocytes	15,9	9 à 31,2
Globules gras		7,2	1,8 à 19,5

Le tableau ci-dessus présente la dimension relative de chaque lignée leucocytaire et la distribution en taille des globules gras du lait. C'est à partir de ces renseignements que nous avons pu choisir le filtre Millipore avec une porosité convenable pour la séparation des leucocytes.

Remarque :

- Il est bien évident que la dimension des leucocytes peut subir des variations au cours de la confection des frottis, la dessiccation et la coloration.

- La distribution en taille des globules gras qui chevauche et superpose celle des leucocytes est un grand obstacle à la numération des leucocytes du lait par des auto-cytomètres électroniques ; en effet, ces appareils comptent toutes les particules sans distinction à l'intérieur des seuils de diamètre choisis. Donc l'utilisation de ces appareils nécessite une totale élimination des globules gras.

IV - EXPLORATION DES FROTTIS ET ETABLISSEMENT DU LEUCOGRAMME DU LAIT

Les frottis préparés à partir du culot leuco-concentré sont colorés et observés au microscope. On effectue une observation rapide au faible grossissement sur l'ensemble de la lame, pour juger de la répartition générale des leucocytes.

Dans les frottis du culot leuco-concentré, les leucocytes sont abondants (surtout les polynucléaires) sur les bords. A l'extrémité de ces frottis, les leucocytes sont tassés et l'on ne trouve que les grandes formes. Au centre, les lymphocytes dominent.

Le mieux est d'explorer les bords en décrivant des méandres suivant un schéma en créneau ou d'explorer la totalité de la surface du frottis en parcourant le frottis parallèlement à sa longueur, sur les trajets très rapprochés, mais à condition de ne pas s'exposer à compter deux fois les mêmes leucocytes (schéma).

Dans le cas de frottis du lait, pour la sincérité des résultats, nous avons établi le pourcentage de chaque catégorie leucocytaire sur 400 leucocytes au moins, comptés à raison de 100 par frottis.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

LEUCO-GRAMME DU LAIT DE VACHE

N° des essais	Nbre des leucocytes comptés	% Poly- nucléaires	Mononucléaires		M P
			% Lymphocytes	% Monocytes	
1	5 184	59 %	26 %	15 %	0,69
2	200	50	40	10	1,00
<u>3</u>	600	68,5	25	6,5	<u>0,46</u>
4	308	49	43	8	1,04
<u>5</u>	1 300	45	49	6	<u>1,33</u>
6	600	55	38	7	0,82
7	400	55,75	26,25	18	0,79
<u>8</u>	850	43,9	47,4	8,7	<u>1,27</u>
9	330	65,8	25	9,2	0,50
10	500	51	37,8	11,2	0,96
11	500	56,6	34	9,4	0,76
12	300	59	29,5	11,5	0,69
	11 072				
Minimum		43,9 %	25 %	18 %	0,46
Maximum		68,5	49	6	1,33
Moyenne		54,87	35,07	10,04	0,86

DISCUSSION

- 1 - Ces douze échantillonnages sont répartis sur trois ans et recouvrent trois lactations des trois vaches laitières suivantes :

<u>Nom des vaches</u>	<u>Lactation</u>
Huldat	5 ^e
Kaline	5 ^e
Fabiola	9 ^e

- 2 - Sur 11 072 leucocytes comptés, nous obtenons la formule leucocytaire moyenne suivante :

Polynucléaires		55 %
Mononucléaires	Lymphocytes	35 %
	Monocytes	10 %
$\frac{\text{Mononucléaires}}{\text{Polynucléaires}}$	$= \frac{M}{P}$	0,86

Ce leuco-gramme est valable pour le lait normal (petit mélange aussi bien que grand mélange).

- 3 - Nous trouvons le rapport $\frac{M}{P}$ voisin de l'unité et en tout cas jamais inférieur à 0,5 pour le lait normal.
- 4 - L'échantillon n° 3 provenait de Huldat dont la mamelle présentait des signes d'une légère infection. Dans les frottis, nous observons une abondance des polynucléaires (jusqu'à 68,5 %) et certains, parmi eux, ont phagocyté des germes, probablement des streptocoques⁽⁺⁾ (planche IV, photo V).
- 5 - Les échantillons n° 5 et 8 provenaient l'un de Kaline et l'autre de Fabiola dont la mamelle était en état de "rétention". (traite

(+) Monsieur le Professeur V. CAUMARTIN, Maître de Conférences à l'Institut de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation de l'Université de Dijon, a bien voulu s'intéresser à mes recherches et ne m'a jamais refusé son aide bienveillante; qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

insuffisante). Dans les frottis de ces laits, nous rencontrons un pourcentage élevé de mononucléaires (de 55 à 56 %), dont certains monocytes présentent une lipophagie (planche IV, photos IV, 1 et 2).

V - ETUDES QUANTITATIVES DES LEUCOCYTES DU LAIT

Ce sont les opérations permettant d'établir le nombre des leucocytes contenus dans un mm^3 de lait.

A - Numération au microscope

A partir de 10 ml. de lait à examiner, on obtient 1 ml. de suspension leuco-concentrée dans l'eau physiologique, dépourvue des globules gras, mais contenant la totalité des leucocytes de 10 ml.

On colore pendant une minute cette suspension au fond du tube avec une petite goutte d'une solution de bleu de méthylène (+) en faisant un mélange homogène. La verrerie utilisée doit être rigoureusement propre et sèche. Nous mettons une goutte de ce mélange dans la cellule à numération de MALASSEZ (schéma) et la numération s'effectue conformément à des méthodes actuellement utilisées en hématologie.

Nous comptons avec un objectif de contraste de phase à sec (grossissement moyen), de façon à embrasser dans le champ du microscope un rectangle de 20 carrés dans la cellule de MALASSEZ.

Cet objectif nous permet de connaître les éventuels globules gras pour ne pas les compter à la place des leucocytes.

Les leucocytes sont colorés en bleu foncé et leur structure cellulaire est observable.

(+) Bleu de méthylène pour bactériologie	10 g
Phénol officinal	10 g
Alcool éthylique à 95°	50 ml

Laisser en contact pendant 48 heures dans un flacon bouché à l'émeri, puis ajouter :

Eau distillée	450 ml
---------------	--------

Filtrer au moment de l'emploi.

B - Numération avec un compteur électronique

Ces appareils, conçus aux U.S.A. depuis 1955 (4), sont actuellement utilisés dans les laboratoires d'hématologie. Certains auteurs ont tenté de compter les cellules (9) ou de déterminer la richesse microbienne du lait (12) avec ces compteurs.

Les méthodes par lesquelles ces auteurs ont préparé leurs échantillons de lait, manquent de précision. En effet, le comptage des cellules du lait par ces appareils nécessite l'élimination des globules gras.

Notre méthode de leuco-concentration convient parfaitement à ces appareils. Nous avons utilisé deux modèles de compteurs électroniques pour le comptage des leucocytes du lait.

1 - Compteur de "COULTER"

Principe -

Il permet de dénombrer une à une des cellules ou particules mises en suspension dans un milieu liquide et d'en effectuer une sélection dimensionnelle.

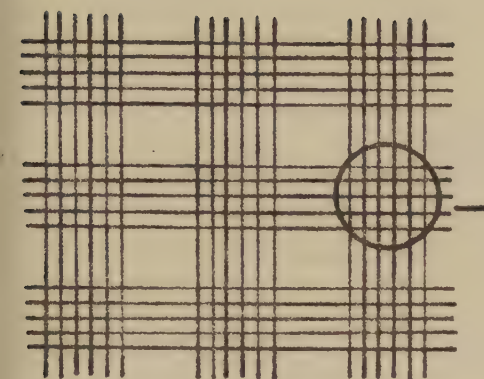
L'organe détecteur est un micro-orifice incorporé à un tube plongeant dans la suspension à dénombrer.

De part et d'autre de ce micro-orifice sont placées deux électrodes de platine, entre lesquelles est appliqué un courant continu.

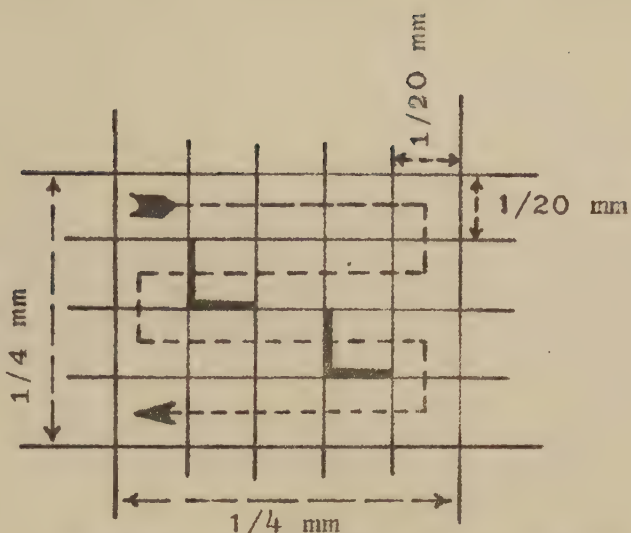
Une aspiration est opérée dans le tube plongeant dans la suspension, les cellules vont donc, avec le liquide, traverser le micro-orifice et au passage de chacune d'elles, l'impédance de ce dernier sera modifiée proportionnellement au volume de la cellule.

Une impulsion électrique sera engendrée, son amplitude sera l'image du volume de l'élément à dénombrer.

Ce détecteur fournit donc deux paramètres : nombre et volume individuels.



RESEAU DE
"LA CHAMBRE A NUMERATION"
DE MALASSEZ



En gras, les côtés des carrés
sur lesquels on compte les éléments
à cheval sur les traits.

Circuit du vide
Idange
TUBE plongeant

Electrodes $\pm$ (courant continu)

Micro-orifice

Echantillon LEUCO-CONCENTRE du LAIT

Signal

Anomètre de mercure

Volume étalon (électrode de départ)

Electrode d'arrêt

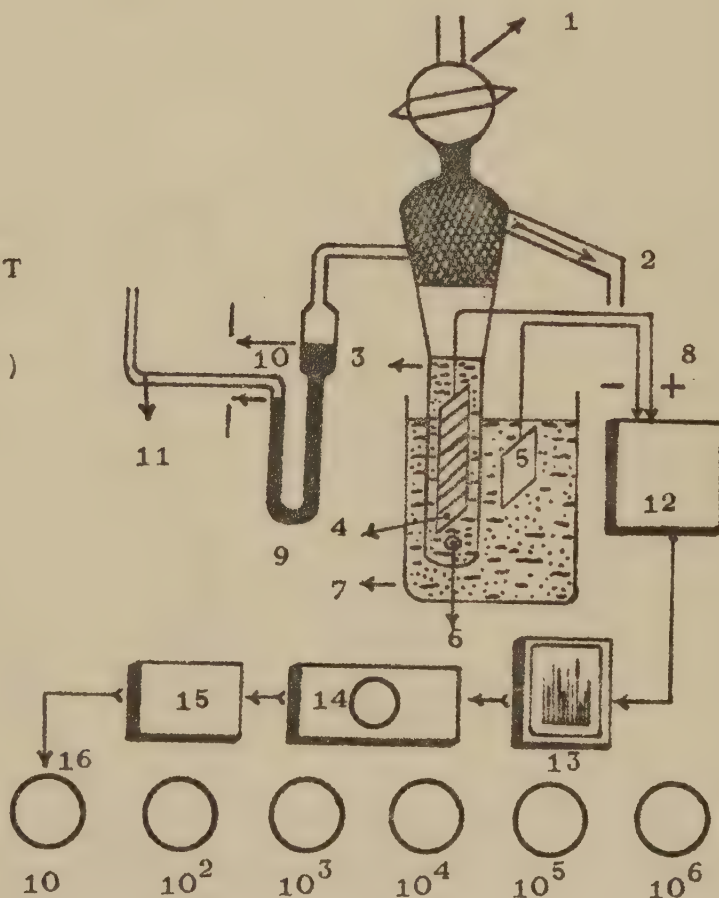
Amplificateur

Oscilloscope du tube cathodique

Règlage du seuil

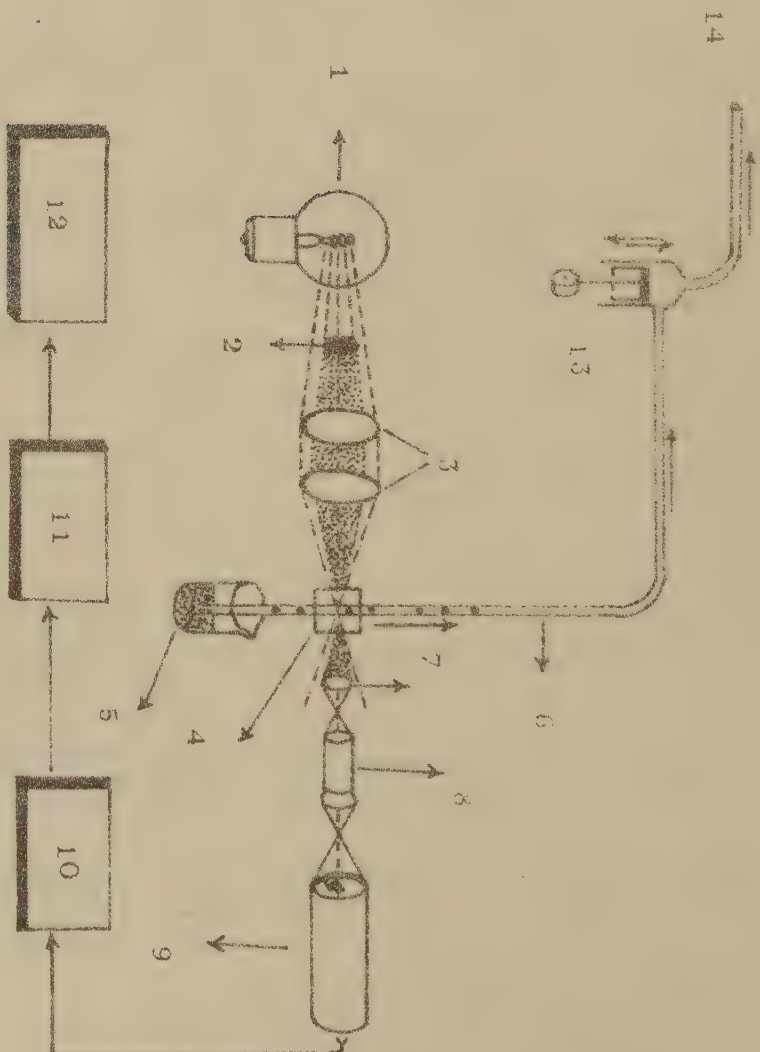
Registreur

Compteur décimal



SCHEMA DE L'ORGANE DETECTEUR ET
DIAGRAMME DU BLOC ELECTRONIQUE
ET MECANIQUE DU COMPTEUR DE
W.H. COULTER

- 1 - Source lumineuse
- 2 - Plaque noire
- 3 - Lentilles convergentes
- 4 - Chambre de micro-comptage
- 5 - LEUCO-CONCENTRE du LAIT
- 6 - Tube de l'aspirateur
- 7 - Lentille
- 8 - Microscope de contrôle
- 9 - Photo-multiplicateur
- 10 - Amplificateur
- 11 - Oscillographe cathodique
- 12 - Enregistreur
- 13 - Aspiration par pistonage
- 14 - Vidange



PRESENTATION SCHEMATIQUE DU SYSTEME OPTIQUE,
ELECTRONIQUE ET MECANIQUE DE
L'AUTO-CYTOMETRE (Type : Fischer)

Nous avons utilisé le compteur de "COULTER" modèle D (+). La population de leucocytes dans nos échantillons de lait présente une gamme de dimensions allant de 3,6 à 31,2 microns ; le seuil de sensibilité de l'appareil a été choisi de telle sorte que tous les leucocytes puissent être comptés.

Chaque comptage se fait en cinq fois afin d'obtenir la moyenne.

Nous avons repris le culot leuco-concentré avec de l'eau physiologique (++) préalablement filtrée pour en éliminer tous les éléments figurés.

PHIPPS et NEWBOULD ont évalué le volume des cellules du lait de 45 à 1 770 micromètres cube (1 micromètre cube = $10^{-18} m^3$). Mais ils trouvent 6000 cellules/mm³ du lait, ce qui n'est pas conforme à nos résultats.

Nous pensons que cette surestimation de la richesse en cellules du lait par ces auteurs est due à l'interférence des globules gras, que les auteurs n'ont pas pu totalement éliminer.

2 - Auto-cytomètre électronique type "FISHER"

Cet auto-cytomètre comporte trois systèmes fondamentaux interconnectés : systèmes optique, électronique et mécanique.

Principe de l'organe détecteur -

Les échantillons automatiquement dilués et mis en suspension entrent dans la cuve à flux continu du compteur.

(+) Monsieur M. CARON, Professeur à la Faculté de Médecine de Dijon m'a permis de réaliser certaines de mes recherches dans son laboratoire à l'Hôpital du Bocage ; je l'en remercie respectueusement.

(++) Formule d'eau physiologique ayant de bonnes qualités de conservation, à savoir :

ClNa Pur P,a	0,9 % pour 5 litres	45 g
HCOH à 40 %	0,05 % " " "	2,5 ml
Merceptyl	0,1 % " " "	5 ml

Bien agiter jusqu'à dissolution du ClNa et filtrer (pH ajusté à 7) .

Ils sont alors sur le trajet des rayons lumineux focalisés. En cas de passage d'une particule, le rayon est diffracté ; de ce fait, il ne frappe plus le disque noir mais un photomultiplicateur d'électrons qui va donner une impulsion électrique.

Ces signaux visualisés par un oscilloscope sont traités électroniquement et convertis en signal analogique pour présentation à l'enregistreur. Chaque particule passant dans le faisceau lumineux donne une impulsion sur le photomultiplicateur.

Dans l'opération avec l'auto-cytomètre, il faut que la propreté soit absolue, car toutes les particules qui tomberont dans la gamme de sensibilité du photomultiplicateur (ici de 1 à 50 microns) seront comptées.

Pour le comptage des leucocytes du lait, nous avons utilisé un autocymètre FISHER, modèle 6-246 Wg (+).

L'un des avantages de ces compteurs est la rapidité du comptage (durée d'un comptage : 35 secondes).

Dans le cas d'un échantillon correctement préparé, le résultat du comptage est reproductible et le coefficient de variation n'atteint que 0,75 - 1,5 %.

Au cours de notre travail, nous avons effectué la numération leucocytaire sur 22 échantillons de lait normal (traite matinale). Ces échantillons provenaient de deux vaches et correspondaient à leur cinquième lactation.

La numération est faite soit avec la cellule de Malassez au microscope à contraste de phase, soit par des compteurs électroniques. Le comptage est répété six fois pour chaque échantillon et la moyenne est retenue. Pour un même échantillon, les résultats obtenus avec un compteur électronique sont légèrement supérieurs à ceux obtenus avec la cellule de Malassez.

Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

(+) Je n'oublierai pas l'aide efficace que m'a apportée, au cours de mes recherches, Monsieur le Dr. C. LALLEMANT, Assistant hospitalo-universitaire à la Faculté de Médecine de Dijon et je lui en garde une amicale reconnaissance.

RICHESSSE LEUCOCYTAIRE DU LAIT DE VACHE

Nom de la vache	Nature du lait	Nombre d'essais	Nbre Leucocytes/mm ³
HULDAT	A Totalité de la traite	1	210
		2	283
		3	460
		4	520
		5	600
		6	530
		7	570
		8	300
		9	666
	B Fin de la traite	10	1 670
		11	1 300
		12	1 600
		13	2 960
		14	1 042
		15	1 030
		16	1 036
		17	1 820
KALINE	A Totalité de la traite	18	140
		19	275
		20	208
		21	132
	B Fin de la traite	22	484
			----- 17 836
		Minimum	132
		Maximum	2 960
		Moyenne	810

DISCUSSION

- 1 - Selon nos essais, le lait normal de vache (grand mélange) contient en moyenne environ 800 leucocytes/mm³.
- 2 - Le contenu leucocytaire du lait dépend directement de la nature du lait et de la modalité d'échantillonnage.
- 3 - Nous constatons que le lait de la fin de la traite est plus riche en leucocytes. Cette augmentation va de pair avec l'accroissement du taux de matière grasse (globules gras de plus en plus grands). Celle-ci pourrait être due au massage de la mamelle qui s'exerce au maximum, normalement à la fin de la traite.
Pour obtenir la richesse leucocytaire favorable, aux recherches de laboratoire, nous recommandons donc le lait de la fin de la traite ; mais en sachant que ce lait est riche aussi en globules gras. On peut les éliminer selon la méthode que nous venons d'expliquer.
- 4 - Le nombre de leucocytes dans le lait varie d'un individu à l'autre. Chez la même vache : le lait de différents quartiers de la mamelle pourrait avoir une richesse leucocytaire différente. La teneur du lait en leucocytes varie avec la période et avec le nombre de lactations (3). La modalité de la traite (manuelle ou mécanique) influe sur le contenu leucocytaire du lait. L'augmentation du vide ou du taux de pulsation dans la machine à traire accroît le nombre de leucocytes du lait (2).
L'âge de l'animal, la production annuelle du lait et le moment du vêlage ont une répercussion sur le contenu cellulaire du lait (10).
- 5 - En tenant compte de tous les facteurs susceptibles d'influencer la teneur cellulaire du lait, les résultats obtenus à partir de nos essais varient de 132 à 2960 cellules/mm³.

VI-LEUCOCYTES DANS LE LAIT STOCKE

Au laboratoire, il nous a paru préférable de travailler sur les leucocytes du lait frais ; mais l'échantillonnage de celui-ci se révèle souvent difficile. Donc, par les expériences suivantes, nous avons voulu éclaircir les comportements morphologiques des leucocytes dans le lait stocké, afin de savoir si on pouvait utiliser le lait stocké pour une étude cytologique.

Première expérience :

Deux litres de lait frais (fin de la traite matinale), dans un flacon fermé, ont été maintenus 270 heures à la chambre froide à +4°C et, dans cet intervalle de temps, ont subi les contrôles suivants :

- détermination des leucocytes/mm.³ au microscope
- mesure du pH (+)
- dosage de l'acidité titrable en degré Dornic (++)

Le tableau suivant montre les résultats obtenus:

Heures après traite	Leucocytes/mm. ³	pH	D
6	1 036	6,5	17
54	1 078	6,2	22
106	1 095	6,2	22
180	1 118	6	24
270	(+)	4,8	55
Augmentation : 7,91 %			
(+) Du fait de la diminution de pH et de l'augmentation de la viscosité, le comptage des leucocytes ne fut pas possible.			

(+) Le pH des échantillons est mesuré à l'aide d'un pH-mètre Beckman à 1/100 près.

(++) Le "degré Dornic" (D) employé en France, exprime une teneur en acide lactique ; l'acidité Dornic est le nombre de dixièmes de ml. de NaOH N/9 utilisés pour titrer 10 ml. de lait en présence de 0,1 ml. de solution phénolphotaléine à 1 P. 100 dans l'alcool éthylique à 95°.

La normalité de NaOH est N/9 parce que l'acide lactique a un poids moléculaire de 90 . On voit que :

1°D. = 1 mg acide lactique dans 10 ml. de lait, soit 0,1g./litre ou 0,01 % d'acide lactique.

Chaque comptage des leucocytes a été fait en six numérations, la mesure du pH répétée trois fois, le degré Dornic trois fois et les moyennes sont retenues.

L'augmentation du $\dot{D}$ et la diminution du pH dans le lait stocké est un phénomène connu, mais l'augmentation des leucocytes avec cet accroissement régulier ne peut être attribuée à de simples erreurs de comptage.

Toutes les numérations sont effectuées dans des conditions rigoureusement identiques.

Cette observation curieuse nous a conduit à recommencer une deuxième expérience.

Deuxième expérience :

Celle-ci fut effectuée sur un autre échantillon de lait, dans des conditions semblables à la première, mais cette fois, chaque comptage de leucocytes a été fait par six numérations et l'erreur standard de la moyenne calculée (+). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Heures après la traite	pH	$\dot{D}$	Leucocytes/mm ³	Leucocytes/mm ³ Variation relative en %
4	6,7	16	666 $\pm$ 7	0
52	6,6	16,5	722 $\pm$ 9	+ 8,4
128	6,5	17,5	750 $\pm$ 11	+ 3,8
198	6,1	25	854 $\pm$ 19	+13,8
Augmentation du 1er au 4e comptage:				28,2 %

(+) Calcul de l'erreur standard de la moyenne : nous utilisons la formule suivante : (6, 11)

$$\sigma_M = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i^j)^2}{N(N-1)}}$$

dont :

σ_M = Erreur standard de la moyenne

$\bar{x}$ = Moyenne de chaque comptage

x_i^j = Valeurs de chacune des six numérations dans un comptage

N = Nombre de numérations dans un comptage = 6

Le lait frais examiné dans cet essai, sur 600 leucocytes comptés, avait le leuco-gramme suivant :

Polynucléaires	55 %	
Lymphocytes	38 %	$\frac{\text{Mononucléaires}}{\text{Polynucléaires}} = 0,82$
Monocytes	7 %	

Donc la formule leucocytaire est normale.

Cette fois aussi, nous constatons une augmentation progressive du nombre des cellules du lait stocké. Cet accroissement du premier au quatrième comptage atteint jusqu'à 28,2 % et cette différence à la quasi-certitude ($P = 0,99$) est hautement significative⁽⁺⁺⁾.

(++) Pour savoir si la différence entre les premier et quatrième comptages était statistiquement significative, nous nous servons des formules ci-dessous :

$$\sigma d = \sqrt{\sigma M_1^2 + \sigma M_4^2}$$

dont :

d. = erreur standard de la différence

M_1^2 = carré de l'erreur standard de la moyenne du premier comptage

M_4^2 = carré de l'erreur standard de la moyenne du quatrième comptage

$$\sigma d. = \sqrt{7^2 + 19^2} = \sqrt{410} = \pm 20,25$$

$$d = M_4 - M_1 = 854 - 666 = 188$$

d = différence entre les moyennes des quatrième et premier comptages.

$$\frac{d}{\sigma d} = \frac{188}{20,25} = 9,28$$

Si le quotient $\frac{d}{\sigma d}$ s'élève à 3, il y a moins de 3 chances sur 1000 en faveur du simple hasard mais, dans notre cas, $\frac{d}{\sigma d}$ est égal à

9,28, donc la différence entre M_4 et M_1 est hautement significative.

Notre troisième expérience s'effectue sur deux litres de lait normal. Ce lait fut maintenu immobile dans un flacon fermé, en chambre froide de +2 à + 4°C pendant 195 heures, soit huit jours.

Avant chaque essai, le lait est bien homogénéisé par retournement du flacon. Nous obtenons les résultats suivants :

Heures après traite	Leucocytes/ mm. ³	pH	D	Leuco-gramme ⁽⁺⁾			M/P
				P %	M		
					L %	m %	
2	140 ± 13	6,6	20	58,5	31,4	10,1	0,73
195	153 ± 3	6,5	23	56,6	34	9,4	0,76

Pour chaque comptage, nous avons effectué six numérations afin de calculer l'erreur standard de la moyenne. La mesure du pH et du du degré Dornic fut répétée trois fois et la moyenne est retenue. Le leuco-gramme fut établi chaque fois sur 850 leucocytes comptés dans neuf frottis.

Après 195 heures, dans les frottis, nous observons beaucoup de bactéries qui se sont développées dans ce lait pendant le stockage et la morphologie, la colorabilité des leucocytes sont moins bonnes que dans le lait frais, mais les catégories leucocytaires sont identifiables.

Cette fois aussi, dans deux comptages successifs, nous constatons une légère augmentation du nombre des leucocytes, mais la différence n'est pas statistiquement significative. Le leuco-gramme établi sur le lait frais ou stocké est similaire.

(+) P = ensemble des Polynucléaires

M = ensembles des Mononucléaires (m+L)

L = Lymphocytes

m = Monocytes

DISCUSSION ET CONCLUSION

1. - L'individualité morphologique des leucocytes reste identifiable au microscope dans le lait stocké à + 4°C, même après 195 heures, soit huit jours. Un stockage prolongé va de pair avec la diminution du pH qui entraîne la coagulation de la caséine (point iso-électrique 4,6). De ce fait, la numération des leucocytes dans ce genre de lait, au microscope, devient impossible.
Donc, pour les recherches au laboratoire, le lait stocké, à défaut de lait frais, peut servir à la numération leucocytaire.
2. - La colorabilité et la structure cellulaire des leucocytaires dans le lait stocké sont moins bien conservées que celles du lait frais, donc pour les observations cyto-chimiques, ultra-structurales et l'établissement de la formule leucocytaire, nous recommandons le lait frais et de préférence, celui de la fin de la traite.
3. - Dans ces expériences, nous constatons une curieuse augmentation progressive du nombre des leucocytes au cours du stockage du lait.

Pour interpréter cette observation, nous formulons les hypothèses suivantes :

a) Cette augmentation pourrait être due à la multiplication de certains leucocytes présents dans le lait et, éventuellement, encore à l'état immature. Cette hypothèse est valable pour les mononucléaires (surtout les monocytes) qui, selon certains auteurs (8, 7), sont les plus viables en culture de tissus et "in vitro". Les autres cellules, en particulier les polynucléaires, étant des éléments tout à fait évolués, sont incapables de se reproduire.

b) Au cours du stockage du lait, l'augmentation des leucocytes est accompagnée d'une diminution du pH. Dans le lait frais, certains leucocytes ne se coloreraient pas avec le bleu de méthylène et, de ce fait, resteraient inaperçus au moment du comptage au microscope ; mais, au cours du stockage, l'acidité favoriserait la coloration et le comptage de ces leucocytes.

Cette hypothèse serait conforme à l'observation de GUITTONNEAU, KEILLING et DEGUY (5). Ces auteurs ont noté une curieuse anomalie de coloration microbienne dans le lait

fortement chauffé (soit pendant une heure à 100°C, soit pendant 20 minutes à 120° C) : "Certains représentants de la flore microbienne du lait chauffé, surtout les ferments lactiques, refusaient de prendre la coloration par le traitement classique au bleu de méthylène aqueux. Mais la colorabilité de ces mêmes microbes au bleu de méthylène redevenait normale lorsqu'on avait traité les préparations par l'acide acétique dilué".

Toutefois, cette explication ne doit pas être retenue si on tient compte de la constatation de PHIPPS et NEWBOULD (9) qui révèlent aussi une augmentation graduelle du nombre des cellules dans le lait emmagasiné à 40°F (4,5° C) mais qui ont effectué les comptages avec un compteur électronique, dans des conditions telles que la question de la colorabilité des leucocytes par le bleu de méthylène ne peut pas être posée. Nous résumons dans le tableau ci-dessous le résultat de l'observation de ces auteurs :

Variation du nombre des cellules du lait stocké à + 4° C

Jours après traite	Cellules comptées à l'auto-cytomètre électronique par mm ³	Erreur standard de la moyenne
0	741	± 5,3
1	761	± 4,9
2	778	± 3,9
5	773	± 3,3
7	800	± 2,5

L'augmentation du premier au cinquième comptage atteint 8 %, ce qui est conforme à nos propres constatations.

REPARTITION DES LEUCOCYTES DANS LE LAIT A L'ETAT STATIQUE (Montée spontanée des globules gras)

Dans les chapitres précédents, nous avons expliqué que les globules gras à l'état d'émulsion dans le lait forment des grappes et, en raison de leur faible densité ($D_{15}^20 = 0,93$ à $0,95$), au moment de la centrifugation ou à l'état statique, ces grappes montent à la

couche superficielle. Rappelons que, plus la température du lait est élevée, plus le nombre de leucocytes retenus par les globules gras est grand. Pour apporter plus de précision à ce phénomène, nous effectuons l'expérience suivante :

Dans un cristalliseur cylindrique ($\phi = 14,5$ cm) on met deux litres de lait frais (lait de mélange de sept vaches). La hauteur du lait dans le cristalliseur atteint 8 cm et sa surface libre 165 cm^2 .

On maintient le cristalliseur pendant 8 heures à la chambre froide (+ 2 à + 4° C) dans une position statique et horizontale.

Le lait étant maintenu au repos, la séparation des globules gras s'effectue en régime laminaire, c'est-à-dire sans turbulence (montée spontanée de la crème). La formule de STOKES (1, 13) permet d'exprimer la vitesse d'ascension des globules gras à la surface du lait.

$$v = \frac{2 D^2 (S - s) g}{9 \eta} \quad \text{dont :}$$

v = vitesse limite de séparation des globules gras

S = masse volumique du lait écrémé

s = masse volumique de la matière grasse

g = accélération de la pesanteur

D ou ϕ = diamètre des globules gras

η = viscosité dynamique du lait écrémé.

Il convient de noter que l'application pure et simple de la formule de STOKES à la séparation de la matière grasse du lait inciterait à penser que le refroidissement freine l'écémage dans la mesure où la viscosité du lait (η) est accrue.

Le fait que l'expérience ne vérifie nullement cette conclusion prouve bien que la séparation des globules gras du lait est un phénomène plus complexe, n'obéissant pas uniquement à la loi de STOKES.

Au bout de huit heures de séjour du lait à l'état statique, la crème forme une couche bien visible à la surface, qui est facilement récupérable. On fait le comptage des leucocytes dans les échantillons suivants :

A : lait bien homogénéisé avant l'expérience :

$$\text{Leucocytes/mm}^3 = 484 \pm 9$$

B : échantillon prélevé par une pipette fine
en-dessous de la crème :

$$\text{Leucocytes/mm}^3 = 79 \pm 5$$

C : après récupération de la crème, le reste
fut bien homogénéisé et les leucocytes
comptés :

$$\text{Leucocytes/mm}^3 = 172 \pm 6$$

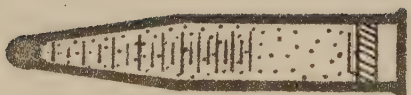
D : la crème fut homogénéisée et la numération
de leucocytes effectuée :

$$\text{Leucocytes/mm}^3 = 503 \pm 6$$

Chaque comptage au microscope a été répété six fois, les moyennes et erreurs standards calculées.

De cette expérience, nous retenons que la quasi-totalité des leucocytes du lait est entraînée avec les globules gras dans la couche de la crème au moment de l'écémage spontané.

Lait centrifugé

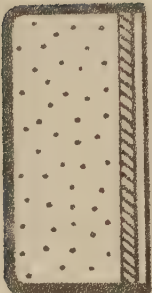


→ crème

→ lait écrémé

→ culot
leuco-concentré

Lait à l'état statique (+4°C)



→ crème riche en leucocytes
(503 ± 6 leucocytes/ mm^3)

→ lait écrémé
(79 ± 5 leucocytes/ mm^3)

ANNEXE DU CHAPITRE IV

La cellule à Numération de MALASSEZ

Pour le comptage des leucocytes du lait au microscope, nous avons utilisé la cellule à numération de MALASSEZ ; c'est une lame porte-objet pourvue dans son centre d'un réseau de deux ensembles perpendiculaires de deux lignes parallèles.

Ces lignes délimitent 25 rectangles, chaque rectangle étant lui-même divisé en 20 carrés.

Chaque rectangle a 0,25 mm. de longueur et 0,20 mm. de largeur, soit une surface de 0,05 mm².

Une lamelle maintenue à 0,20 mm. de la lame délimite des parallélépipèdes rectangles ayant une base de 0,05 mm² et une profondeur de 0,20 mm. soit un volume de 0,01 mm³ (schéma p. 42 a).

La totalité du quadrillage correspond à un volume de 1 mm.³

Réglage du microscope

La chambre garnie est placée sur la platine du microscope disposée horizontalement ; après 5 à 10 minutes, temps nécessaire à la sédimentation des leucocytes, la lecture peut être entreprise. La mise au point s'effectue sur le quadrillage.

Méthode de comptage

On compte les leucocytes dans la totalité de la surface de cellule de Malassez. En tenant compte du taux de dilution ou de la concentration de la suspension leucocytaire utilisée, on peut en déduire le nombre de leucocytes dans 1 mm.³ de lait initial.

Erreur de numération

Les erreurs de numération sont fréquentes et peuvent provenir soit de l'observateur, soit d'un manque de rigueur de l'étalonnage du matériel (erreur instrumentale), soit de la méthode elle-même (erreur expérimentale).

Précision du résultat

Dans les conditions habituelles de numération, on évalue l'erreur maximum à 10 % environ, mais si les opérations sont effectuées avec soin, les erreurs seront moindres.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ALFA-LAVAL/DE LAVAL - Le guide des séparateurs centrifuges modernes, Stockholm, n° 25120 - F7
- 2 - AFIFI Y.A. - Neth. Milk & Dairy J., (1968), 22, 98
- 3 - BLACKBURN P.S. - J. Dairy Res., (1966), 33, 193
- 4 - COULTER W.H. - Proc. Natn. Electron. Conf., (1956), 12, 1034
- 5 - GUITONNEAU G. et BRIGANDO J. - Le lait, (1936), 16, 577
- 6 - HELLER R. - Manuel de statistique biologique, ed. G.V., Paris, (1968), p. 195
- 7 - HALPERN B., ROBINEAUX R., KOURILSKY R., LEPINAY A. et L.-BRIOT M. - Bull. Soc. Chim. Biol., (1968), 50, 1059
- 8 - MARCHAL G. et DUHAMEL G. - Le sang, 3e éd., P.U.F., Paris, (1967), 194, Coll. "Que sais-je ?", p.51
- 9 - PHIPPS L.W. et NEWBOULD F.H.S. - J. Dairy Res., (1966), 33, 63
- 10 - PROBST A., BEHRINGER J. et KIERMEIER F. - Milchwissenschaft, (1968), 23, 395
- 11 - SCHREIDER E. - La biométrie, éd. P.U.F., Paris, (1960), 781, Coll. "Que sais-je ?", p.27
- 12 - TOLLE A., ZEIDLER H. et HEESCHEN W. - Milchwissenschaft, (1966), 21, 93
- 13 - VEISSEYRE R. - Techniques laitières, 2e éd. Maison Rustique, Paris, (1965), p. 265
- 14 - WILD (Heerbrugg) - Mikroskopion, Suisse, (1968), 5, n°15, p.20

CHAPITRE V

I - RAPPORTS LEUCOCYTAIRES SANG-LAIT

Pour étudier les éventuels rapports leucocytaires entre le sang et le lait, chez le même sujet, nous avons effectué des expériences sur une vache saine à la fin de sa sixième lactation.

Le lait examiné provient de la fin de la traite.

Le prélèvement du sang est fait immédiatement après la traite, par ponction veineuse (veine jugulaire) sur un anticoagulant constitué par le mélange de WINTROBE (+).

Sur le lait et le sang ainsi prélevés, nous déterminons :

- le nombre de leucocytes/mm³
- le leuco-gramme
- le rapport : $\frac{\text{Mononucléaires}}{\text{Polynucléaires}}$

Ces expériences furent répétées sur trois échantillons.

Chaque comptage leucocytaire a été effectué six fois et la moyenne en est retenue. Les leuco-grammes sont établis sur 1 500 leucocytes comptés à raison de 100 cellules par frottis.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

(+) Je remercie très vivement Monsieur le Dr.-vét. P. COLLIN (Directeur de laboratoire) et Monsieur P. MORELON, Dr.-vét. Inspecteur en Chef (Directeur des Services Vétérinaires de la Côte d'Or) pour l'aide très précieuse qu'ils m'ont apportée en effectuant les prélèvements de sang sur animal.

Essais	Nombre de leucocytes/mm ³	Leuco-grammes			M P (+)
		Polynucléaires %	Mononucléaires Lymphocytes %	Monocytes %	
2 mai 1968	Sang	57	40	3	0,73
	Lait	45	49	6	1,33
3 mai 1968	Sang	55	39	6	0,63
	Lait	32,8	43,2	24	2,04
18 août 1968	Sang	43,62	50,29	6,07	1,29
	Lait	43,88	47,41	8,70	1,27

$$(+) \frac{M}{P} = \frac{\text{Mononucléaires}}{\text{Polynucléaires}}$$

Nous avons fait le prélèvement du sang veineux sur un anticoagulant constitué par le mélange de WINTROBE de formule :

Oxalate de potassium	0,8 g
Oxalate d'ammonium	1,2 g
Eau distillée	100 ml

- 1 - Déposer 1 ml du mélange de WINTROBE dans chaque flacon destiné à recevoir 10 ml de sang.
- 2 - Sécher les flacons à l'étuve à 37 °C, ou mieux au four à 100 °C.

Nous avons également utilisé un autre anticoagulant : l'ANTICLOT des Laboratoires DELAGRANGE, PARIS, à raison de 1 goutte pour 5 ml de sang.

REMARQUE IMPORTANTE

Quel que soit l'anticoagulant utilisé, il faut savoir que le stockage prolongé de sang modifie toujours la forme et le nombre des éléments figurés.

Les numération cellulaires, et tout particulièrement la numération leucocytaire devront de préférence se faire dans l'heure qui suit le prélèvement.

Quant à la formule leucocytaire, il est préférable de l'effectuer sur un frottis de sang exécuté immédiatement après la ponction.

DISCUSSION

1. - La richesse leucocytaire du lait est de 4 à 9 fois plus petite que celle du sang.
2. - Le leuco-gramme d'un lait normal est très voisin de celui du sang.
3. - Dans nos essais, la mamelle était en état de rétention. C'est pourquoi le rapport M/P dépasse l'unité.
4. - Le rapport M/P est souvent plus grand dans le lait que dans le sang ; ceci pourrait être un argument en faveur de la double origine, à la fois sanguine et lymphatique des mononucléaires dans le lait.

II - L'AGE RELATIF DES POLYNUCLEAIRES

NEUTROPHILES DANS LE LAIT

Les polynucléaires neutrophiles sont les plus nombreux de la formule leucocytaire de lait, puisqu'ils entrent dans la proportion de 44 à 68 %.

Généralement, les polynucléaires ont un noyau plus ou moins divisé en lobes. Nous ne considérons, comme lobes, que ceux qui sont bien détachés et reliés aux autres par un mince filament.

Le nombre des lobes du noyau n'est pas le même dans tous les polynucléaires. Ils sont d'autant plus nombreux que la cellule est plus mûre. (MALLARME)

Selon ARNETH, il y a un parallélisme étroit entre le nombre des noyaux et l'âge des leucocytes polynucléaires (2,3).

ARNETH a classé les polynucléaires du sang suivant les segments de leur noyau en cinq catégories et vingt classes, ce qui permet d'apprécier la maturité générale des polynucléaires par comparaison avec la formule normale de segmentation qui est la suivante :

- 5 % à noyau non segmenté
- 35 % à deux lobes
- 41 % à trois lobes
- 17 % à quatre lobes
- 2 % à cinq lobes et au-dessus.

L'abondance des cellules à noyau non segmenté indique la dominance des cellules jeunes.

L'indice nucléaire

C'est le total des lobes de cent polynucléaires; il est normalement de 250 à 300 dans le sang ; il augmente lorsque le nombre des cellules âgées domine et diminue lorsque les cellules sont plus jeunes. (1)

En se basant sur ces données, nous avons voulu savoir si la population de polynucléaires du lait est relativement plus âgée ou plus jeune que celle du sang.

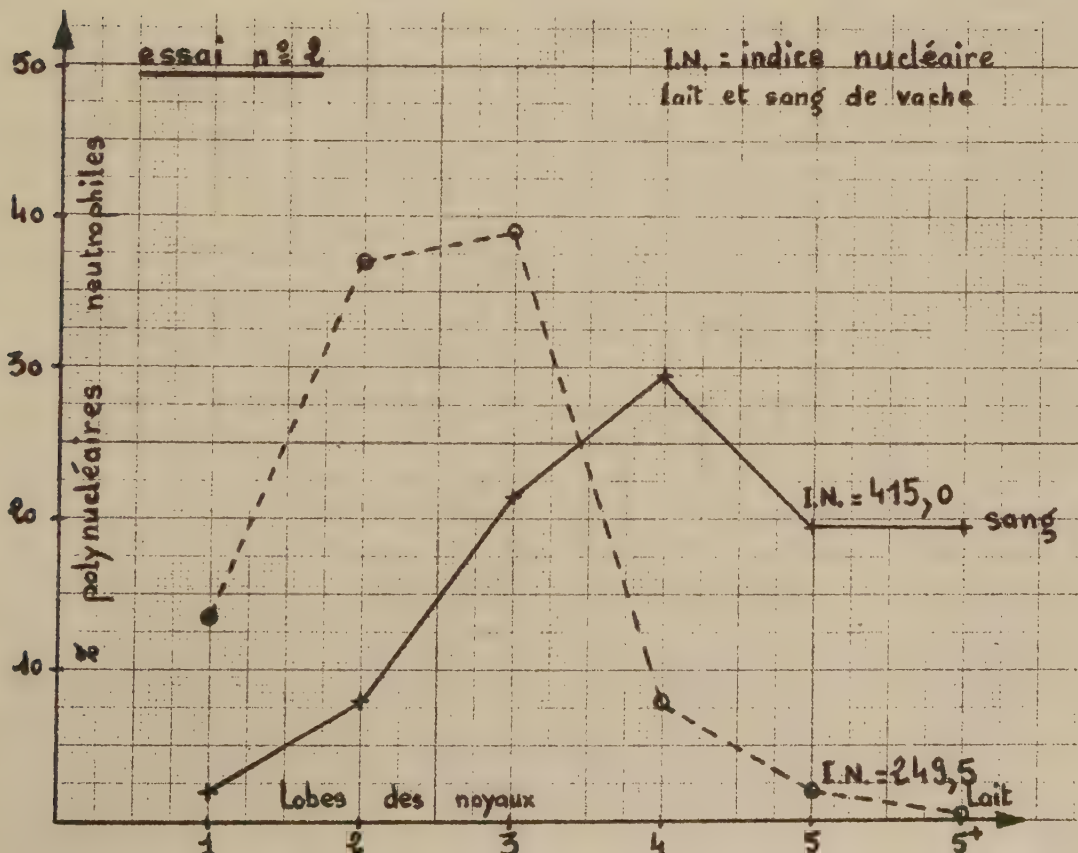
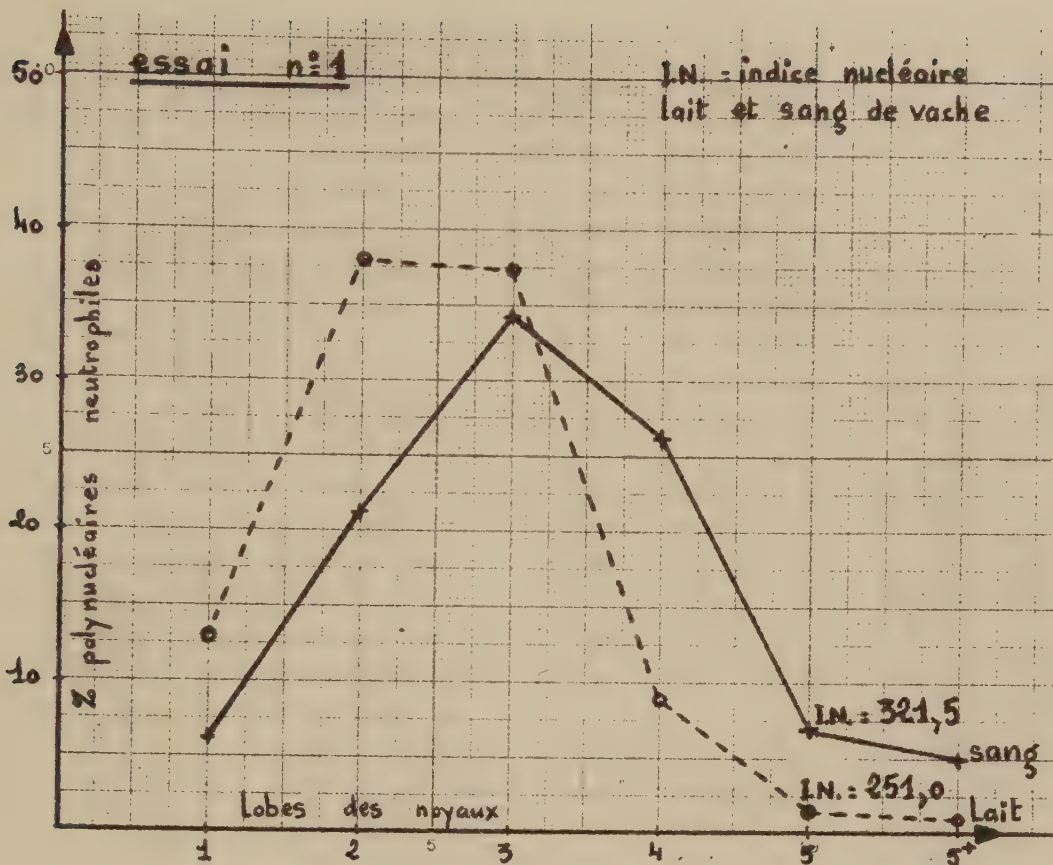
Pour cela, nous avons établi la formule d'ARNETH relative au sang et au lait, simultanément prélevés, du même sujet sur plus de 1000 polynucléaires.

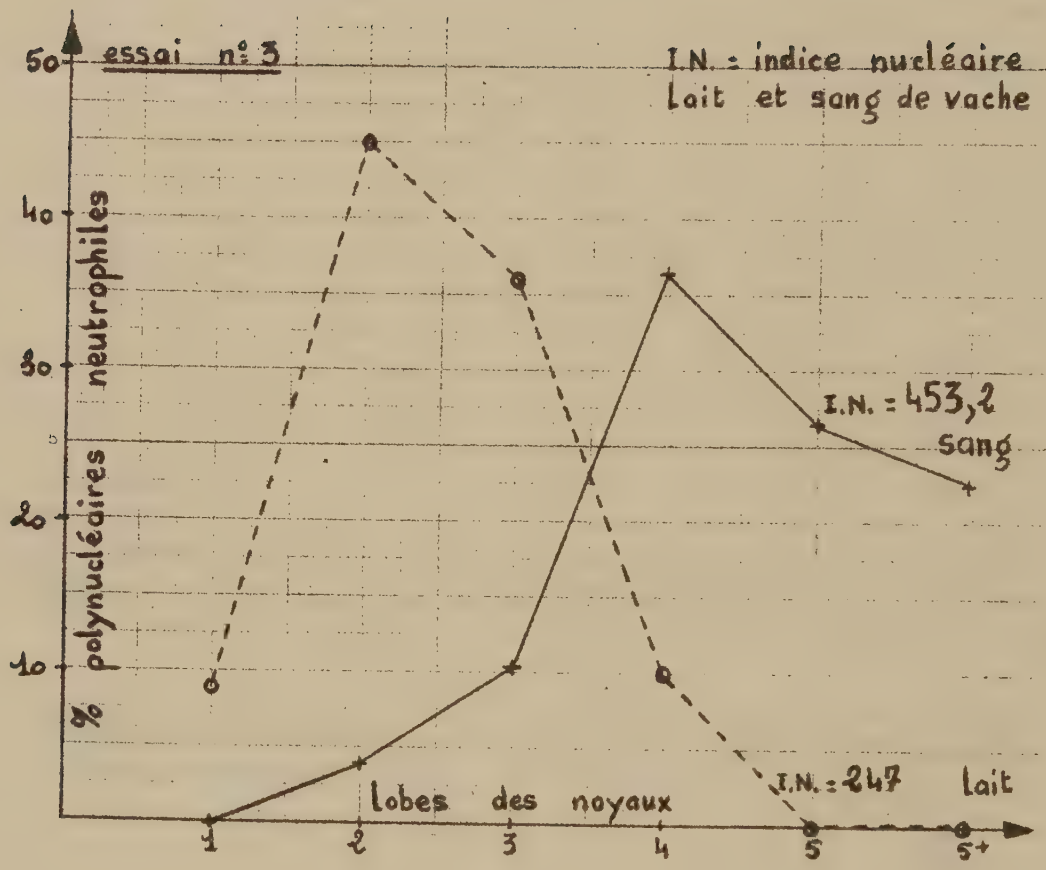
Chaque cellule est observée, identifiée et le nombre des noyaux est compté ; l'indice nucléaire est calculé.

Nous avons répété cette expérience trois fois et les résultats sont présentés selon les graphiques suivants :

Formule d'Arneth: 5 groupes (formule simple) et 20 catégories (formule développée)

Légendes	1	2	3	4	5
● M = Myélocyte	● M. 0%	● 2K 0,3%	● 3K 2,3%	● 4K 3,8%	● 5K 1%
● W = Métamyélocyte	● W. 0,2%	● 2S 23,5%	● 3S 5,6%	● 4S 9,07%	● 4K1S 0,4%
● T = gr à noyau en batonnet	● T. 5%	● 1K1S 11,7%	● 2K1S 16,7%	● 3K1S 6,4%	● 3K2S 0,4%
● K = Segment de noyau arrondi			● 1K2S 16,4%	● 3S1K 1,6%	● 4K2S 0,07%
● S = Segment de noyau allongé			Total = 41%	● 2K2S 4,7%	● 3K3S 9,07%
				Total = 16,6%	Total = 19%





Nous constatons que le nombre des polynucléaires relativement jeunes est plus élevé dans le lait que dans le sang ; donc, l'indice nucléaire du lait est plus petit que celui du sang.

Cette observation est aussi valable dans le lait de femme et cela pourrait être considéré comme l'une des preuves en faveur de la sélectivité du passage des leucocytes dans le lait.

III - LEUCOCYTES DU LAIT DE FEMME

Après avoir mis au point les méthodes d'études des leucocytes dans le lait de vache, nous avons effectué des recherches sur le lait de femme (planche I, photo III).

Le lait de femme nous est fourni par une donneuse bébévole de 22 ans qui allaitait son deuxième enfant (naissance de l'enfant le 13 août 1968).

Le lait prélevé était sain et normal (contrôle du pH et de l'acidité Dornic). Ce lait est recueilli par une tireuse électrique et le milieu de la traite est prélevé pour les expériences.

Sur les quatre échantillons de lait de femme, nous avons effectué les expériences suivantes :

A - Numération leucocytaire

Elle est réalisée soit à l'aide de la cellule de Mallassez au microscope, soit en utilisant l'auto-cytomètre électronique. Nous obtenons les résultats suivants (moyennes de 6 comptages dans chaque échantillon) :

ESSAIS	pH	D	leucocytes/mm ³
20.8.1968	7,3	4	1 715
22.8.1968	7,19	3,5	4 003
24.8.1968	7,05	5	3 532
20.9.1968	7	6,5	750
Moyenne	7,16	4,75	2 504

On constate que :

- 1° - Le lait normal de femme a un pH neutre ou faiblement alcalin
- 2° - Le lait du début de lactation est plus riche en leucocytes que celui du milieu
- 3° - Le nombre des leucocytes dans le lait de femme est plus élevé que dans le lait de vache ; la moyenne atteint jusqu'à 2 500 leucocytes par mm³
- 4° - Le lait de femme étant moins riche en globules gras que le lait de vache, notre méthode de leuco-concentration s'effectue aisément.

B - Leuco-gramme et rapport leucocytaire sang-lait
chez la femme

Le lait et le sang sont prélevés simultanément (+) sur un même sujet. L'expérience porte sur quatre échantillons.

Les leuco-grammes sont établis sur 1000 leucocytes en raison de 100 cellules par frottis. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant.

(+) Je remercie Mademoiselle M. MAGNIEN, Surveillante en Chef à la maternité de Dijon (Directeur M. le Professeur F. BARON), pour la gentillesse avec laquelle elle m'a fourni les échantillons du lait et du sang de femme.

Date	Essais chez la femme	Nombre de leucocytes/mm. ³	Leuco-grammes				$\frac{M}{P}$
			Polynucléaires %	Mononucléaires			
				Lymphocytes %	Monocytes %		
20 août 1968	Sang	8 500 = 4,95	58,75	36,75	4,50	0,7	
	Lait	1 715	3,3	91,4	5,3	29,4	
2 août 1968	Sang	7 700 = 1,92	75,75	16	8,25	0,32	
	Lait	4 003	29,14	69,71	1,14	2,43	
24 août 1968	Sang	7 200 = 2,03	60,75	28,5	10,75	0,64	
	Lait	3 532	0,75	97	2,25	132,3	
20 sept. 1968	Sang	5 950 = 7,9	64,75	24,50	10,75	0,54	
	Lait	750	5,3	94,1	0,6	17,86	

On peut conclure que :

- 1° - La richesse leucocytaire du lait de femme est de deux à neuf fois plus petite que celle du sang
- 2° - Le leuco-gramme d'un lait normal de femme ne montre pas de similitude avec celui du sang
- 3° - Le rapport M/P est toujours plus grand dans le lait que dans le sang.

C - Caractéristique leucocytaire du lait de vache et du lait de femme

Dans le tableau suivant, nous comparons les valeurs leucocytaires moyennes du lait de femme et du lait de vache :

Lait		Leucocytes/mm. ³	Leuco-gramme			$\frac{M (+)}{P}$
			P%	M		
				L%	m%	
Vache	Maximum	2 960	68,50	49	18	1,33
	Minimum	132	43,90	25	6	0,46
	Moyenne	810	54,87	35,07	10,04	0,86
Femme	Maximum	4 003	29,14	97	5,30	132,30
	Minimum	750	0,75	69,71	0,60	2,43
	Moyenne	2 504	9,70	88,05	2,18	45,50

De cette comparaison, il ressort que :

- 1° - Le lait de femme est plus riche en leucocytes que le lait de vache.
- 2° - Dans le lait de femme, un grand pourcentage des leucocytes revient aux lymphocytes, tandis que chez la vache, souvent les

polynucléaires dominant. C'est pourquoi le rapport M/P dans le lait de femme est beaucoup plus grand que celui du lait de vache.

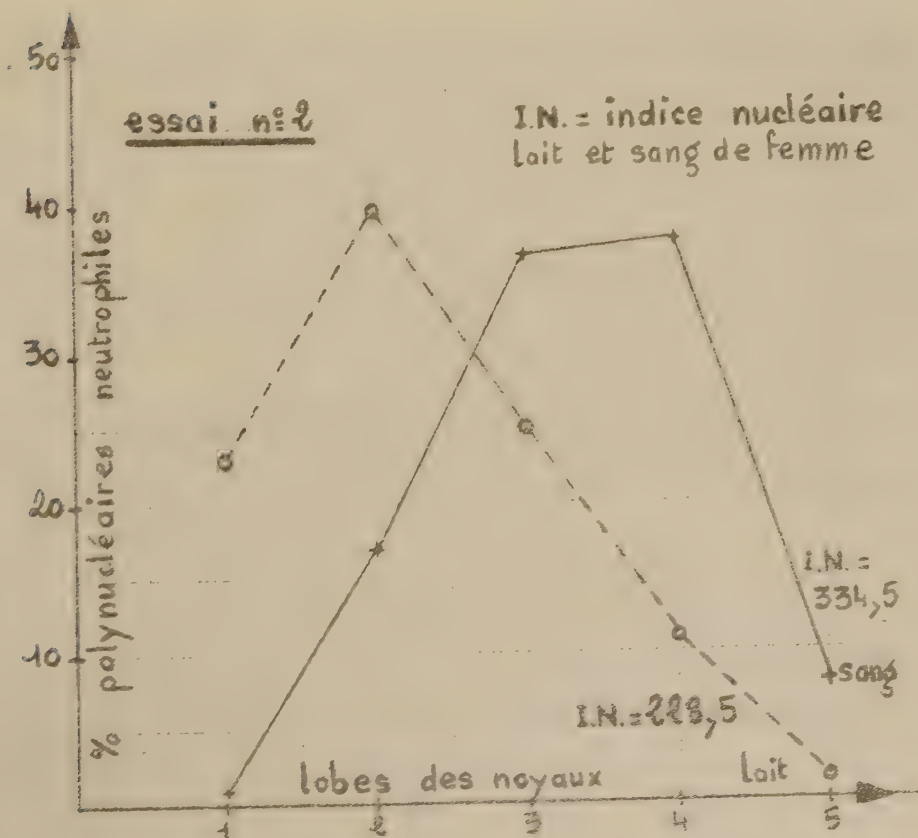
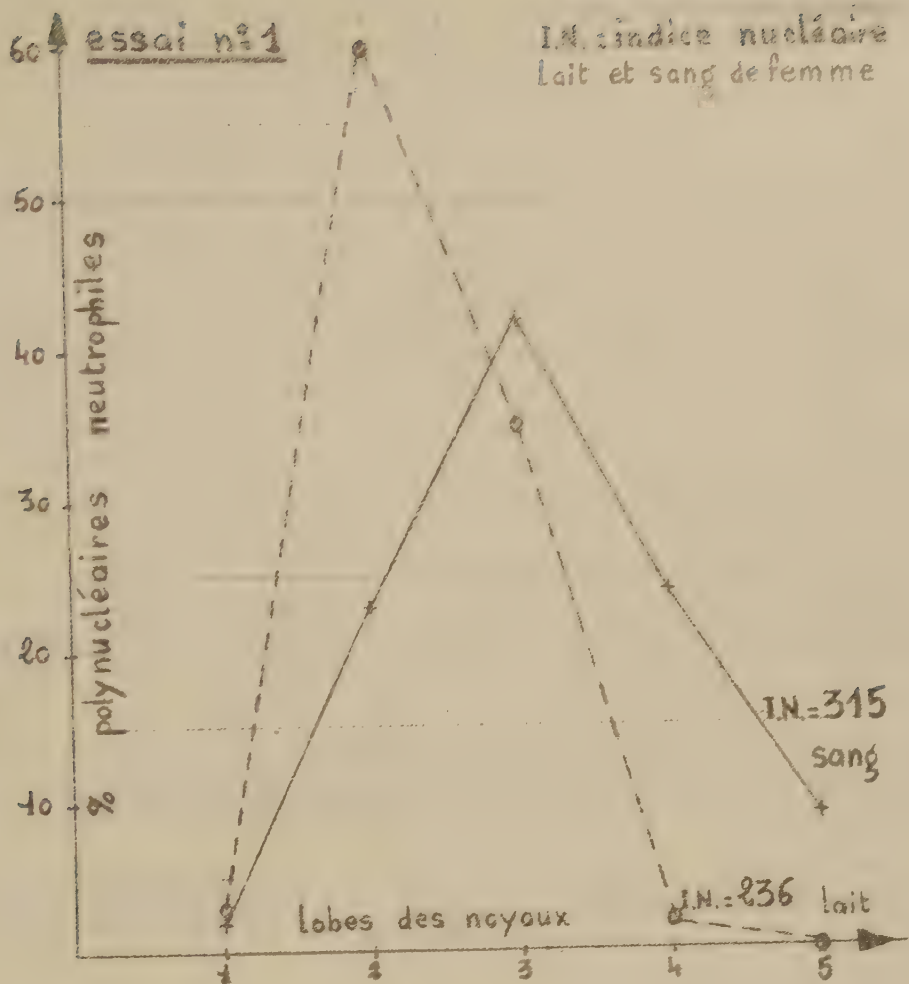
D - L'âge relatif des polynucléaires dans le lait et le sang de femme

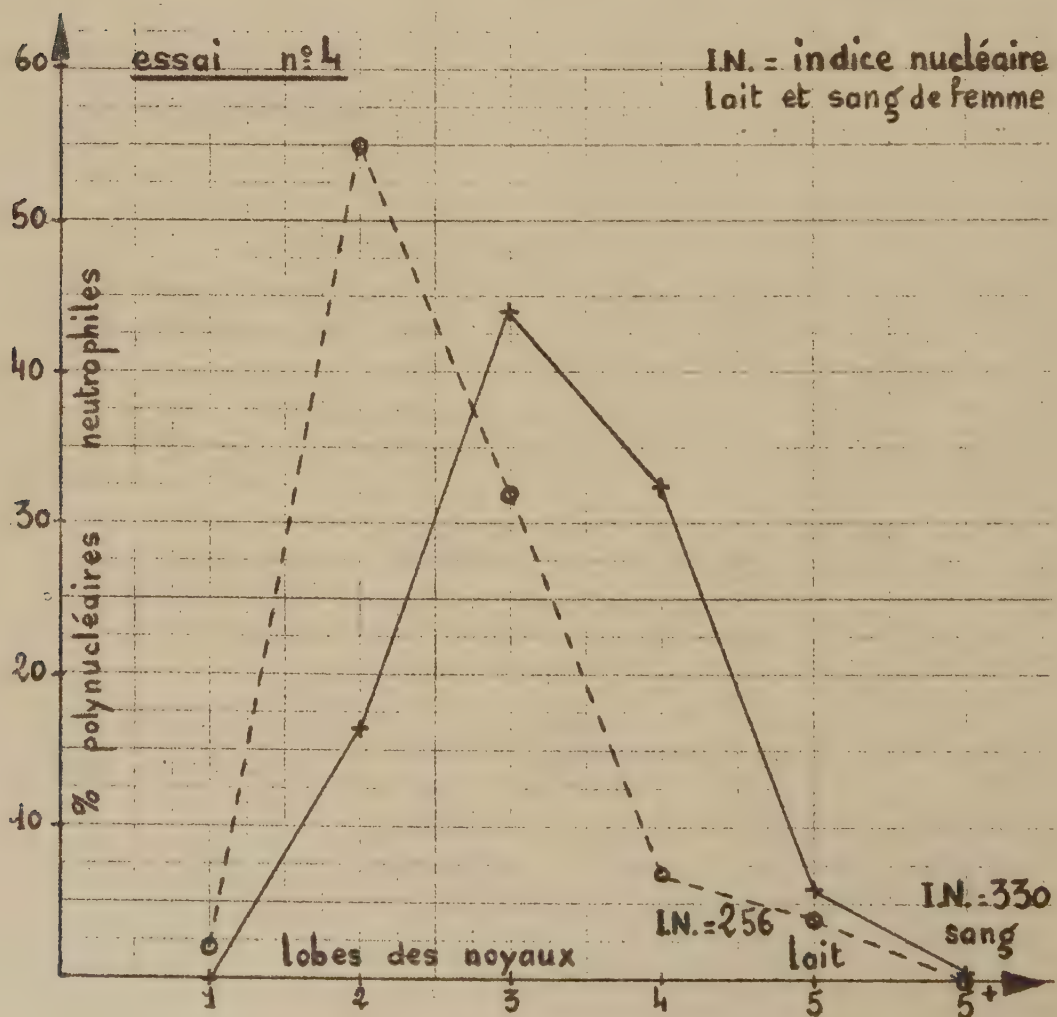
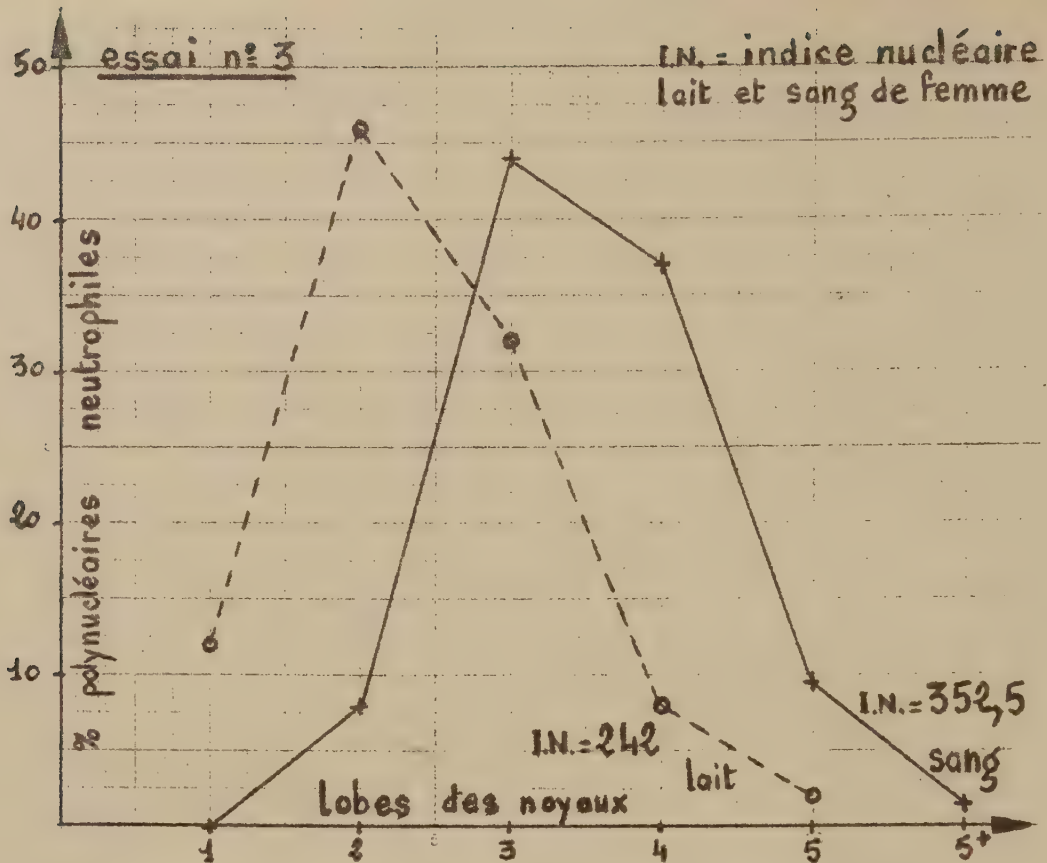
Sur plus de 1000 polynucléaires comptés dans chacun des quatre échantillons du lait et du sang de femme (soit 8000 polynucléaires comptés et identifiés), nous avons établi la formule d'ARNETH relative et avons calculé les indices nucléaires respectifs. Les résultats sont présentés selon les quatre graphiques ci-après.

De ces expériences, nous concluons que les polynucléaires du lait sont relativement plus jeunes que ceux du sang chez le même sujet, aussi bien chez la vache que chez la femme.

BIBLIOGRAPHIE

1. - CHEVALLIER P. - La lecture d'un examen hématologique, éd. Wallon, Vichy, Paris, (1960), P. 68
2. - DITTRICH H. - Dans "The Physiologie and pathologie of Leucocytes" : J. BRAUNSTEINER et D. ZUCKER-RANKLIN, éd. GRUNE et STRATTON, New-York et London, (1962), P. 130
3. - STORTI E. - Diagnostic des maladies du sang, éd. G. Dain, Paris, (1959), P. 23





CONCLUSIONS

Nous pouvons résumer les principaux résultats de la première partie de notre travail comme il suit :

- 1 - A la suite de nos recherches bibliographiques, nous constatons que peu de travaux détaillés ont été effectués jusqu'à présent sur les LEUCOCYTES du LAIT.

La plupart des auteurs ont étudié l'ensemble des cellules du lait sans avoir établi entre elles de distinction.

Il nous a paru donc nécessaire de définir la position des leucocytes parmi d'autres cellules du lait.

- 2 - Les leucocytes constituent la plus grande partie du contenu cellulaire du lait, ils sont souvent vivants, actifs, quelques-uns mobiles, constants dans le lait, mais en qualité et quantité très variables.
- 3 - Les leucocytes du lait pourraient avoir une double origine : origine SANGUINE pour les Polynucléaires, et origine à la fois SANGUINE et LYMPHATIQUE pour les Mononucléaires.
- 4 - Dans le but de généraliser nos résultats, nous avons prélevé des échantillons de lait de VACHE et de FEMME sur des sujets à caractéristiques moyennes.
- 5 - Nous nous sommes rapidement rendu compte qu'une étude des leucocytes du lait sans élimination des GLOBULES GRAS était quasiment impossible. Dans ce but, nous nous sommes attachés à connaître les caractéristiques physico-chimiques des globules gras afin de pouvoir choisir comment les éliminer et obtenir un lait LEUCO-CONCENTRE.
- 6 - Nos observations en microscopie Photonique et Electronique révèlent qu'un m.m.³ de lait renferme sous la forme d'une émulsion 2 à 6 millions de globules gras dont le diamètre varie de 0,1 à 20 microns.
- 7 - Les globules gras ont tendance à se réunir en GRAPPES ; c'est à ce type de groupement qu'est due la montée spontanée de ceux-ci et nous avons montré que ces grappes des globules gras retiennent et aussi entraînent des leucocytes à la surface du lait.
- 8 - La température élevée (au-dessus de 30°C) favorise le regroupement des globules gras parce qu'elle modifie leurs "Propriétés de Membrane". Nous avons pu constater que dans le lait chauffé les globules gras sont individuellement plus grands et plus regroupés en grappes que dans le lait refroidi.

- 9 - Dans le lait refroidi (au-dessous de + 10°C) nous trouvons les globules gras relativement petits et dispersés.
Ils sont moins susceptibles d'entraîner et de retenir les leucocytes.
- 10 - Pour la plupart de nos expériences, nous avons besoin de leucocytes du lait morphologiquement intacts et autant que possible biologiquement actifs. Devant la carence des méthodes précédentes, nous avons donc cherché à mettre au point une méthode de LEUCO-CONCENTRATION du lait, respectant ces impératifs.
En conséquence, nous avons adopté, comme règle, d'éviter tout chauffage du lait.
- 11 - Par la centrifugation de 6000 à 15 000 g. pendant 15 minutes d'un lait frais, de la fin de la traite, refroidi à + 2 - + 4°C, il est possible d'éliminer les globules gras et d'obtenir une suspension leuco-concentrée contenant l'ensemble des leucocytes de l'échantillon.
- 12 - La préparation des leucocytes du lait selon notre méthode a donné de bons résultats dans nos observations en microscopie photonique ou électronique et dans nos essais cyto-enzymologiques. Nous avons pu identifier et photographier au microscope les différentes lignées leucocytaires du lait.
- 13 - L'affinité tinctoriale et la morphologie des leucocytes du lait normal sont comparables à celles des leucocytes du sang ; nous apportons des précisions sur leur structure et sur leur morphologie.
- 14 - Nos expériences quantitatives nous ont permis d'évaluer la richesse leucocytaire du lait. Nous proposons deux méthodes de comptage, soit par numération au microscope en contraste de phase, soit au moyen de l'auto-cytomètre électronique.
Nous constatons que le lait de fin de la traite est plus riche en leucocytes que le lait prélevé au début ou au milieu de la traite.
- 15 - Nous avons par ailleurs établi LA FORMULE LEUCOCYTAIRE du lait. Le lait normal de vache présente une formule leucocytaire très voisine de celle du sang.

LEUCOCYTES DU LAIT NORMAL (Valeurs moyennes)

Lait	Nombre de leucocytes/mm ³	Leuco-gramme			Rapport $\frac{M}{P}$
		P %	M		
			L %	m %	
Vache	800	55	35	10	0,8
Femme	2 500	10	88	2	9

P : Polynucléaires

M : Mononucléaires (Lymphocytes + Monocytes)

L : Lymphocytes

m : Monocytes

Comme il ressort de ce tableau, la composition leucocytaire du lait de Femme montre beaucoup de différences par rapport à celle du lait de vache.

- 16 - L'échantillonnage du lait frais étant souvent difficile pour les recherches de laboratoire, nous avons tenté de connaître le comportement des leucocytes dans le lait STOCKE.

Nous constatons que l'individualité morphologique des leucocytes reste identifiable au microscope dans le lait stocké à + 4°C, même après 195 heures, soit huit jours; mais la colorabilité et la structure cellulaire des leucocytes dans le lait stocké sont moins bien conservées que celles du lait frais.

Donc pour les études cyto-chimiques, ultra-structurales et l'établissement de la formule leucocytaire, nous recommandons le lait frais et de préférence, celui de la fin de la traite.

- 17 - Nous avons étudié le rapport leucocytaire Lait-Sang chez un même sujet. Nous constatons que le rapport Mononucléaires du lait de vache Polynucléaires ou du lait de femme est plus élevé que dans le sang. Ceci pourrait être un argument en faveur de la double origine à la fois sanguine et lymphatique des Mononucléaires dans le lait.

- 18 - En se basant sur la formule d'ARNETH, nous avons voulu savoir si la population de Polynucléaires du lait est relativement plus âgée ou plus jeune que celle du sang.

De nos expériences, nous concluons que les polynucléaires du lait sont relativement plus jeunes que ceux du sang chez le même sujet, aussi bien chez la vache que chez la femme.

Cette observation pourrait être considérée comme l'une des preuves en faveur de la sélectivité du passage des leucocytes dans le lait.

DEUXIEME PARTIE

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons effectué les recherches suivantes :

I - Etude de l'activité biologique des leucocytes dans le lait :

- Intégrité morphologique
- Mobilité et chimio-tactisme
- Phagocytose et lipophagie

II - Etude des leucocytes du lait en microscopie électronique :

- Préparation de l'échantillon
- Coupe ultra-fine des leucocytes dans le culot leuco-concentré
- Coupe ultra-fine sériée des leucocytes étalés parallèles et perpendiculaires au plan d'étalement
- Préparation des leucocytes du lait et observation au microscope électronique à balayage
- Tentative de localisation des activités phosphatasiques acide et alcaline au niveau des leucocytes du lait en microscopie électronique

III - Détections cytochimiques d'activités enzymatiques au niveau des leucocytes du lait en microscopie photonique :

- Péroxydase
- Phosphatase acide
- Phosphatase alcaline
- Oxydases

IV - Dosages biochimiques des activités :

- Phosphatasique acide
- Phosphatasique alcaline
- Butyrylcholinestérasique
- Catalasique

sur le lait entier, la crème, le lait écrémé, culot leucoconcentré et culot broyé.

TROISIEME PARTIE

Après avoir analysé et synthétisé les résultats des première et deuxième parties, nous envisageons les problèmes suivants :

- I - Utilité de l'étude cytologique dans l'inspection de la qualité du lait
- II - Discussion sur les problèmes de l'épuration centrifuge en vue d'éliminer les cellules du lait dans l'industrie laitière et les lactariums
- III - Nécessité du refroidissement du lait depuis sa récolte jusqu'au premier traitement thermique en vue de ralentir les activités enzymatiques.

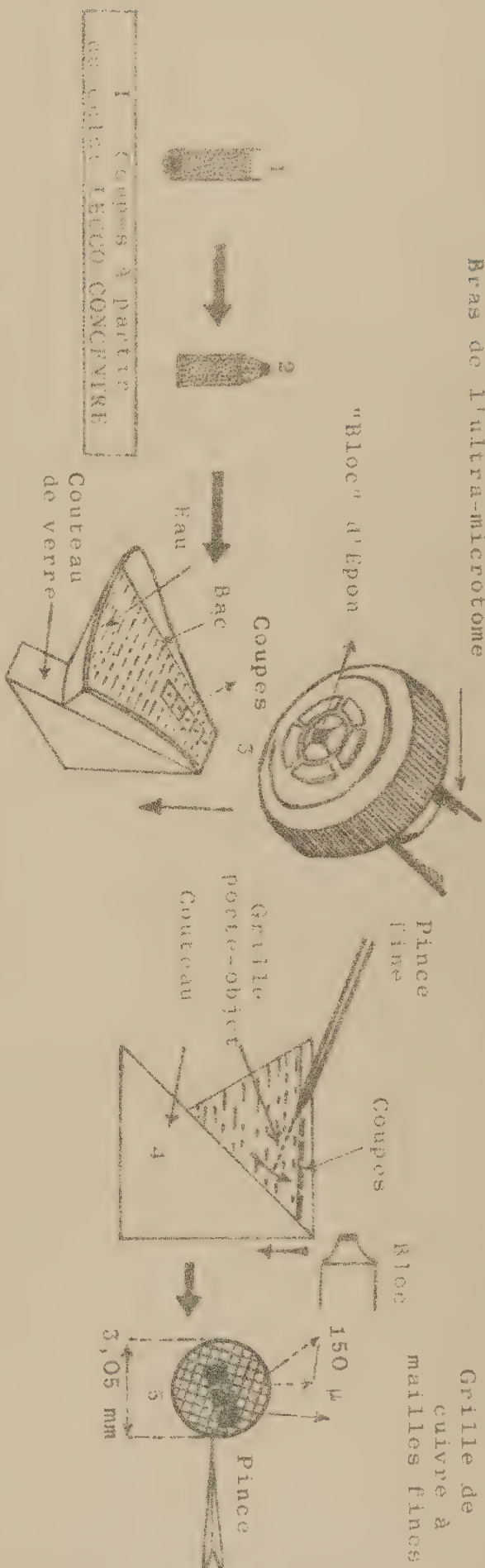
Les résultats obtenus dans la seconde et la troisième parties de notre travail, dont les sujets figurent ci-dessus, feront l'objet de publications et d'exposés ultérieurs.

"Mener à son terme un travail" est une expression bien illusoire et bien présomptueuse car le chercheur scientifique ne peut jamais considérer qu'une œuvre de recherche soit terminée. Personnellement, le champ des recherches que nous avons entreprises est loin d'être exploré en totalité et nous avons conscience d'avoir soulevé plus de problèmes que nous n'en avons résolus.

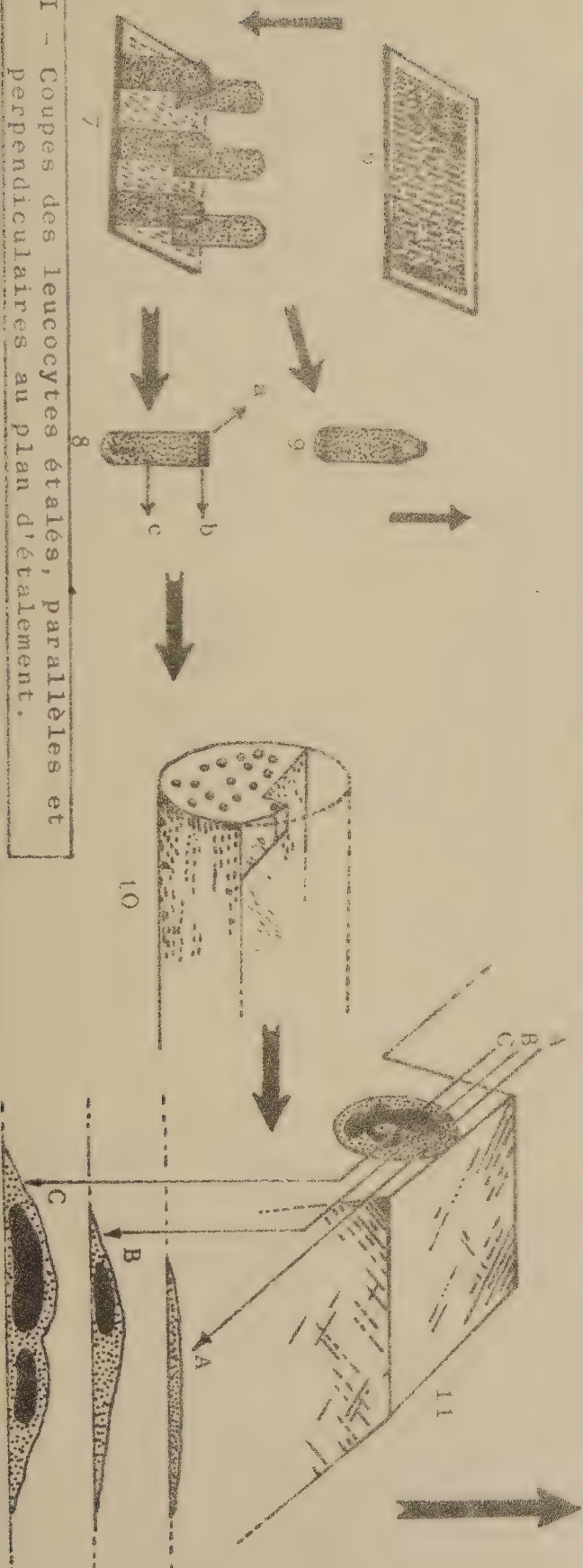
LEGENDE

- 1 - Capsule de gélatine renfermant le culot (Leuco-concentré fixé et déshydraté) dans l'Epon
 - 2 - Bloc polymérisé taillé en pyramide
 - 3 - Ultra-microtomie
 - 4 - Positions du couteau du bloc taillé et repêchage des coupes : vues de profil
 - 5 - Grille de cuivre à mailles fines (mailles carrées à 150 microns de côté)
 - 6 - Lame recouverte de Formvar (ou Carbon) et des leucocytes étalés
 - 7 - Capsules remplies de résine retournées sur la lame à l'emplacement des leucocytes
 - 8 - Capsule détachée après polymérisation partielle
 - a) couche transparente de Formvar ou carbon
 - b) leucocytes étalés (localisation s'effectuant au stéréomicroscope
 - c) résine
 - 9 - Bloc polymérisé, taillé en pyramide pour l'obtention des coupes parallèles au plan d'étalement
 - 10 - Taille de pyramide pour obtenir des coupes perpendiculaires au plan d'étalement
 - 11 - Schéma, à un plus fort grossissement
- A, B, C - Coupes obtenues à différents niveaux de la cellule

Bras de l'ultra-microtome



REALISATION DE COUPES ULTRAFINES DE LEUCOCYTES DU LAIT POUR L'OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE



II - Coupes des leucocytes étalés, parallèles et perpendiculaires au plan d'étalement.

PLANCHE III

A : Multiplié par 16700, c'est un petit lymphocyte dont le diamètre apparent atteint jusqu'à 7,5 microns.

Le cytoplasme (CY) est peu abondant (moins de 1/10 de la surface de coupe) et son épaisseur, dans les différents endroits, varie de 0,17 à un micron.

La membrane cytoplasmique présente un contour sinueux, montrant des étirements d'amplitude variable de 5000 à 8300 Å (ondulation de la membrane plasmique (OMP)).

Ceci permet de penser que la surface cellulaire n'est pas lisse, mais décrit des ondulations. Dans le cytoplasme, on observe deux mitochondries juxtaposés.

Le noyau (N), contrairement au cytoplasme, est important, mesurant dans son grand axe 5,85 microns.

La membrane nucléaire (MN) qui enveloppe le noyau est bien visible. Dans le noyau, on peut identifier deux parties bien distinctes: l'une sombre et compacte, correspondant à la chromatine (CH) qui se présente en plusieurs grosses mottes denses, l'autre plus claire : le suc nucléaire ou nucléoplasme qui remplit les espaces inter-chromatiniens.

Dans la coupe, on observe plusieurs globules gras colorés en noir (osmiophiles) dont les dimensions varient de 1000 à 7000 Å.

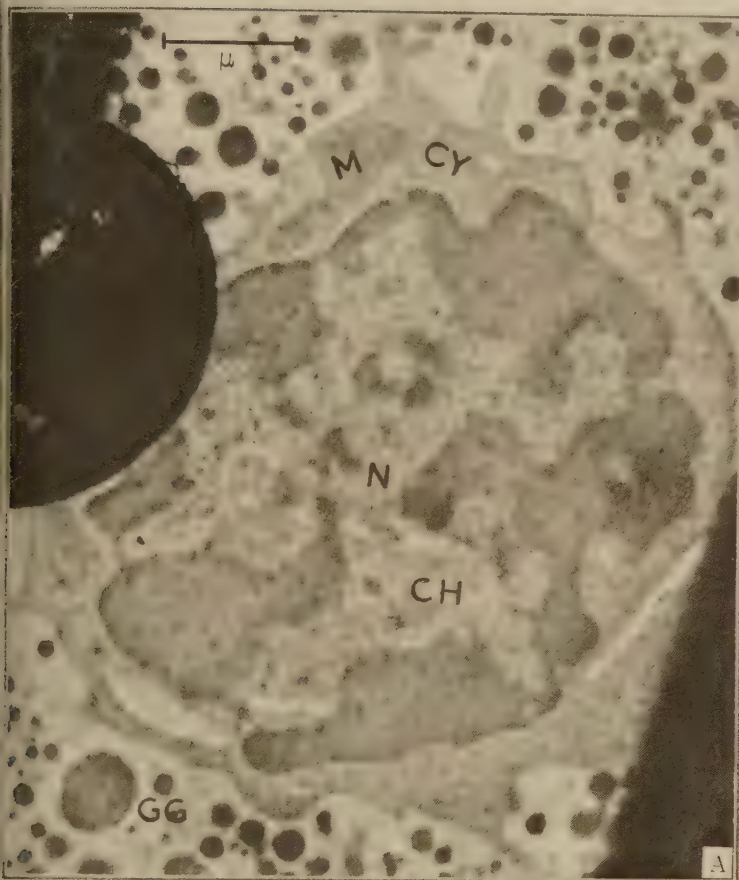
B : Une partie de la cellule à un fort grossissement (x 41200).

C : Polynucléaire du lait, (x 8200).

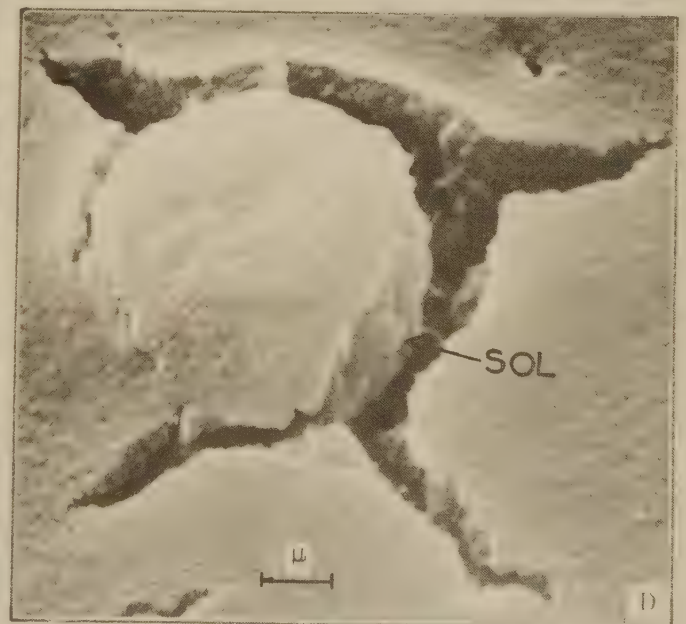
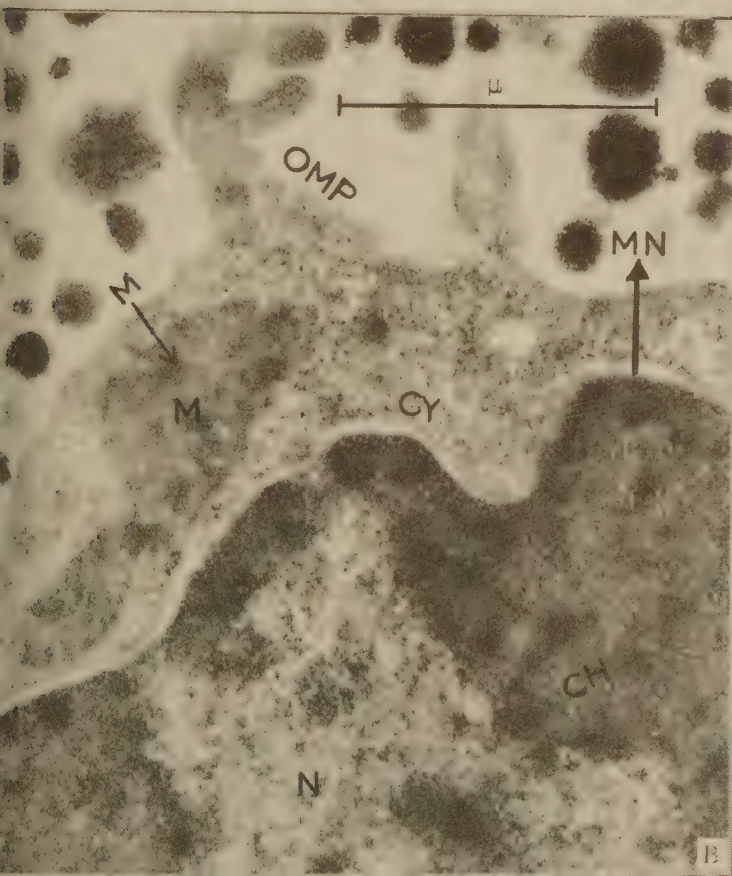
D : Lymphocyte du lait, (x6300).

vus au microscope électronique à balayage.

Dans la figure D, la surface ondulée du Lymphocyte (S.O.L.) est visible.



I - Coupes ultrafines vues au Microscope Electronique par Transmission. (A & B,



II - Topographie de la surface leucocytaire vue au Microscope Electronique à Balayage. (C & D)

PLANCHE IV

PHOTOGRAPHIES (X 1800) :

I - 1, 2 Monocytes, 3,4 Polynucléaires : positifs à la réaction de PEROXYDASE

L'activité est surtout localisée dans le cytoplasme - Substrat : H_2O_2 dilué

Milieu d'incubation : Para-diaminodiphenyl à 0,1 %
(Techniques de SATO, SEIKIYA et BRADFIELD modifiées)

+ + +

II - a) 1 Monocyte, 2 Lymphocyte : positifs à la réaction de PHOSPHATASE ALCALINE

b) 3 Polynucléaire : positifs à la réaction de PHOSPHATASE ACIDE

Substrat : b-Glycérophosphate de sodium à 2 %
(Méthode de GOMORI, WACHSTEIN, RABINOVITH et RHEINGOLD)

+ + +

III - A, B, C : dégagement des bulles d'oxygène (O_2)
vu au microscope

+ + +

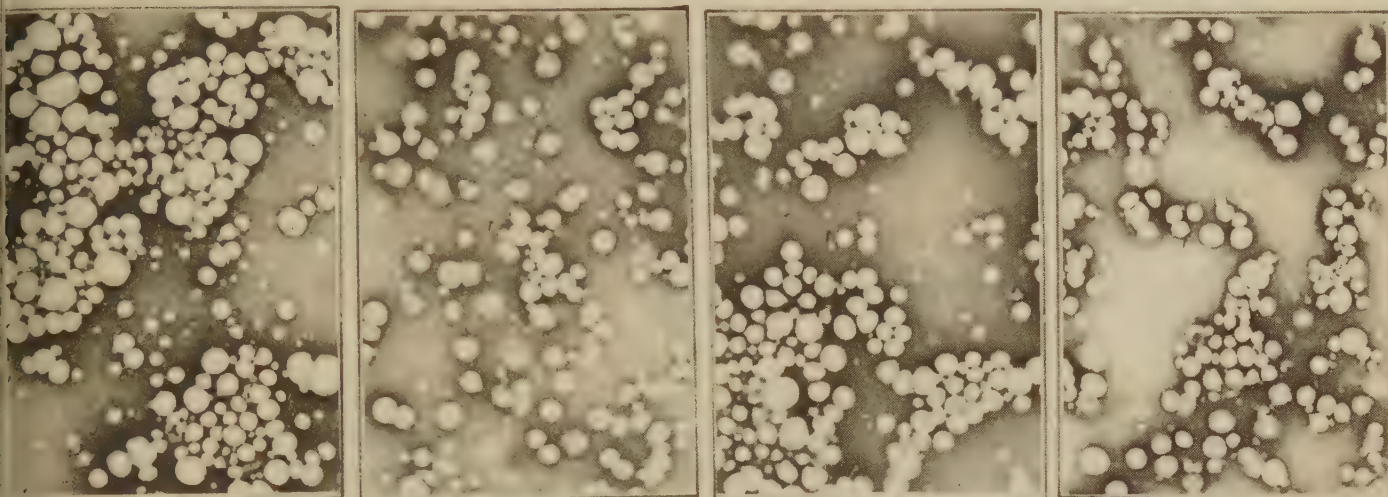
IV - 1, 2 Le cytoplasme de ces monocytes est bourré des petits globules gras

+ + +

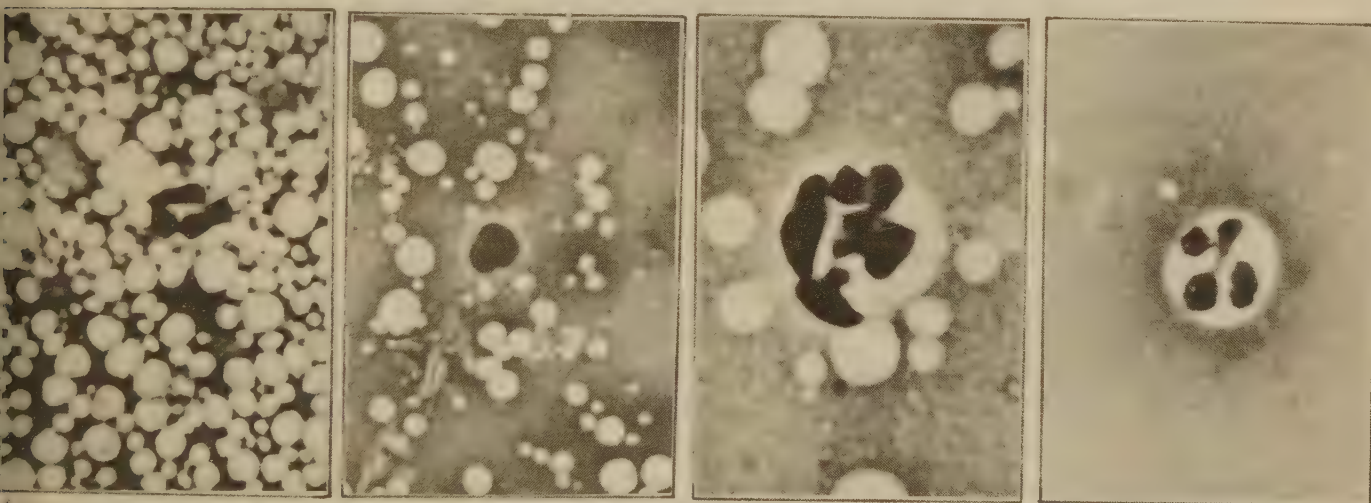
V - 1, 2, 3, 4 Les polynucléaires ont phagocyté les streptocoques

Lipophagie des Monocytes et Phagocytose des Polynucléaires sont des preuves de la VIABILITE de ces cellules dans le lait.

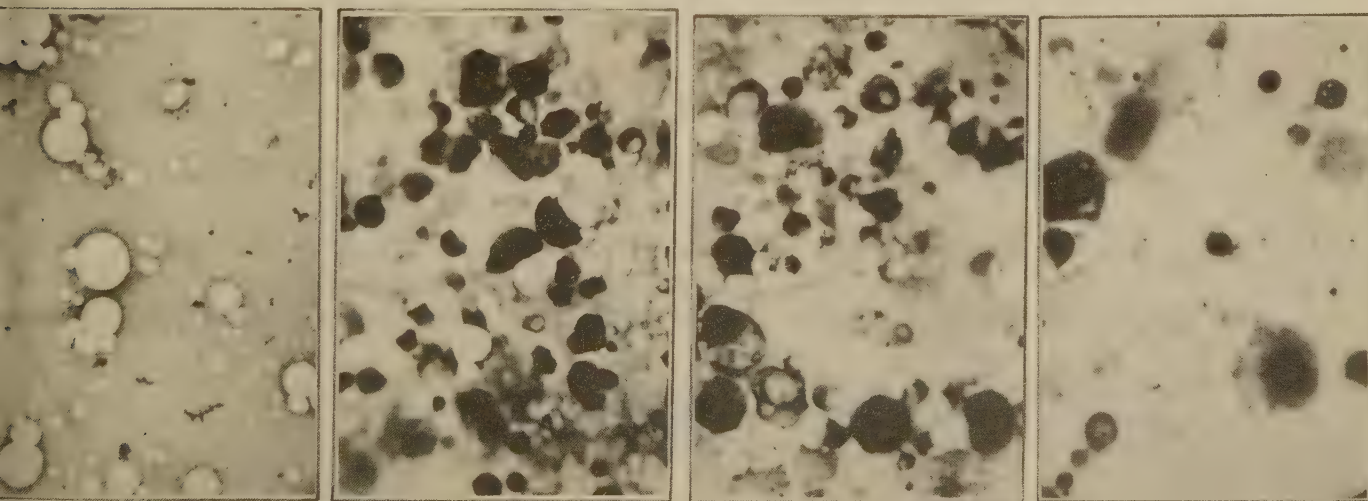
I - Variations de la forme et des propriétés de la paroi
des globules gras en fonction de la température du lait.



II - Elimination des globules gras et LEUCO-CONCENTRATION DU LAIT.



III - LAIT de FEMME et ses leucocytes.



RESUME DE COMMUNICATION PRESENTE
AU COLLOQUE FRANCO-SUISSE DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE
(Lausanne, mai 1969)

ARBABI P. et BARON C. - Etude microscopique de leucocytes
du lait.

Les leucocytes du lait sont comptés soit par numération en contraste de phase, soit au moyen de l'autocytomètre électronique (1, 2). Le nombre total des leucocytes du lait de vache varie entre 200 et 2 000 par mm^3 , selon les modalités de l'échantillonnage.

L'affinité tinctoriale et la morphologie des leucocytes du lait normal de vache est comparable à celles des leucocytes du sang. Le rapport Mononucléaires/Polynucléaires du lait de vache, ou du lait de femme est plus élevé que dans le sang. La recherche cytochimique de l'activité peroxydasique donne des résultats positifs avec les polynucléaires neutrophiles et négatifs avec certains monocytes et tous les lymphocytes.

Nous avons essayé d'étudier les leucocytes du lait en microscopie électronique d'une part selon la technique de BRETON-GORIUS (3) et d'autre part, en utilisant une double fixation prolongée du culot dans une solution de glutaraldéhyde à 3 % dans le tampon phosphate pH 7,3 durant 18 heures, puis dans une solution à pH 7,3 de tétroxyde d'osmium à 1 % pendant 10 heures à +4° C.

De nombreux globules gras adhèrent à la pseudomembrane du leucocyte ; cette adsorption semble être favorisée par des déformations de la membrane cytoplasmique du leucocyte, bien visibles au microscope électronique, l'amplitude de ces ondulations chez les petits lymphocytes du lait varie de 5 000 à 8 300 Å.

(1) PHIPPS L.W. et NEWBOULD F.H.S., 1966, J. Dairy Res.,
33, 51

(2) TOLLE A., ZEIDLER H. et HEESCHEN W., 1966,
Milchwissenschaft, 21, 93

(3) BRETON-GORIUS J. (REGENT J.), 1968, J. Microscopie, 7, 95

P L A N

	Pages
- <u>INTRODUCTION</u>	1
- <u>GENERALITES</u>	2
I - Position du problème	3
II - Bref aperçu historique des recherches effectuées jusqu'à présent sur les cellules du lait	4
III - Origine des cellules du Lait Normal	8
IV - Orientation de notre travail	10
Bibliographie	12
- <u>RECHERCHES PERSONNELLES</u>	15
<u>Première partie : Etudes biométriques</u>	16
<u>CHAPITRE I</u>	17
I - Provenance de nos échantillons	17
II - Prélèvement des échantillons	17
III - Expériences préliminaires	18
IV - Confection des frottis	18
<u>CHAPITRE II</u>	21
I - - Elimination des globules gras pour étude cytologique du lait	21
A - Utilisation des solvants organiques	21
B - Elimination des globules gras et enrichissement du lait en cellules par centrifugation	22
II - Critique de la méthode de BOURGEOIS et distribution des leucocytes dans le lait centrifugé	23
III - Structure physico-chimique des globules gras du lait	24
IV - Etude du comportement morphologique des globules gras en fonction de la température du lait	25
Bibliographie	27

<u>CHAPITRE III</u>	28
I - Méthodes de leuco-concentration du lait	28
Discussion	28
II - Purification et lavage des leucocytes du lait	29
A - Technique de concentration des leucocytes du lait sur filtre Millipore	30
B - Lavage du culot leuco-concentré	33
III - Coloration des frottis	33
IV - Examen des frottis au microscope	34
V - Conservation des frottis	34
Bibliographie	34
 <u>CHAPITRE IV</u>	 35
I - Description des leucocytes du lait	35
II - Affinité tinctoriale et morphologie des leucocytes du lait	35
III - Mesure du diamètre apparent des leucocytes du lait	36
IV - Exploration des frottis et établissement du leucogramme du lait	38
Leucogramme du lait de vache	39
Discussion	40
V - Etudes quantitatives des leucocytes du lait	41
A - Numération au microscope	41
B - Numération avec un compteur électronique	42
1 - Compteur de "Coulter"	42
2 - Autocymètre électronique type "Fisher"	43
- Richesse leucocytaire du lait de vache	45
- Discussion	46
VI - Leucocytes dans le lait stocké	47
Discussion et conclusion	51
Répartition des leucocytes dans le lait à l'état statique	52
Bibliographie	55

CHAPITRE V	56
I - Rapports leucocytaires Sang-Lait	56
Discussion	58
II L'âge relatif des polynucléaires neutrophiles dans le lait	58
III - Leucocytes du lait de femme	60
A - Numérations leucocytaires	60
B - Leuco-gramme et rapport leucocytaire sang-lait chez la femme	61
C - Caractéristique leucocytaire du lait de vache et du lait de femme	63
D - L'âge relatif des polynucléaires dans le lait et le sang de femme	64
Bibliographie	64
Conclusions générales	65
<u>Deuxième partie</u>	67
<u>Troisième partie</u>	68

PLAN DE L'ANNEXE

Pages

- Schéma de technique de la confection et de l'exploration des frottis	19-1
- Légende de la planche I	27-1
- Planche I (12 microphotographies)	27-2
- Schéma de la méthode de LEUCO-CONCENTRATION du lait	29-1
- Coloration des frottis des leucocytes du lait	34-1,2,3
- Légende de la planche II	36-1
- Planche II (12 microphotographies)	36-2
- Schéma de la cellule de Malassez, compteurs électroniques de Coulter et de Fischer	42-1,2
- Schéma de la répartition des leucocytes dans le lait à l'état statique et centrifugé	54-1
- Cellule de Malassez et méthode de comptage au microscope	54-2
- Anticoagulants utilisés	57-1
- Schéma de la formule d'Arneth	59-1
- Courbes de l'âge relatif des polynucléaires du lait et du sang de vache	59-2,3
- Courbes de l'âge relatif des polynucléaires du lait et du sang de femme	64-1,2
- Légende et schéma de la technique de coupes ultra-fines des leucocytes du lait	68-1,2
- Légende de la planche III	68-3
- Planche III (4 microphotographies électroniques) ..	68-4
- Légende de la planche IV	68-5
- Planche IV (16 microphotographies)	68-6
- Résumé de communication au colloque de LAUSANNE ...	68-7

THESE DE DOCTEUR INGENIEUR

Numéro d'ordre 107

Vu et approuvé
Le Doyen de la Faculté des Sciences

R. CIRY

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de DIJON

H. GALLET de SANTERRE

